

西日本産フグの毒性に関する研究

Toxicological Studies on Puffer Fish
in Western Japan

1998 年 12 月

長崎大学大学院
海洋生産科学研究科

渚 祐一

目 次

序 論	1
第1章 西日本産フグ及びフグ毒保有動物の毒性	9
第1節 ヒガンフグ <i>Takifugu pardalis</i>	11
第2節 コモンフグ <i>Takifugu poecilonotus</i>	20
第3節 ホシフグ <i>Arothron firmamentum</i>	27
第4節 フグ毒保有動物	39
第5節 要 約	47
第2章 フグ肝臓の伝統的調理法における除毒	49
第1節 フグ専門店入荷フグ2種の肝臓毒性	50
第2節 伝統的調理法及びその除毒効果	60
第3節 伝統的調理法の除毒機構	67
第4節 要 約	76
第3章 除毒によるフグ肝臓利用の検討	78
第1節 有毒肝臓における毒の分布	79
第2節 フグ毒の加熱による減少と減毒推定式	85
第3節 効率的な除毒方法の検討	98
第4節 要 約	108
第4章 簡易フグ毒検査法の確立と汎用化	110
第1節 HPLC法における簡易化の検討	111
第2節 簡易フグ毒検査法の確立	120
第3節 汎用化例	129
第4節 要 約	138
第5章 総合考察	139
謝 辞	145
文 献	146

序 論

我が国におけるフグ食中毒の特徴は、発生件数、患者数は多くないにもかかわらず死亡率がきわめて高いことである。特にフグを食する機会の多い西日本地方ではほとんど毎年死者が発生しており、最新の平成 8 年厚生省統計でもフグ中毒の死者 3 名はいずれも広島県と長崎県での事故であった(厚生省, 1996)。

フグの毒性について谷(1945)は、北九州産フグ 21 種を調べ、有毒フグはすべてフグ科 Tetraodontidae に属し、魚種・個体・部位・季節により毒性が異なることを明らかにした。その毒力表は、1983 年 12 月の厚生省通知による可食リストの指定まで、フグの毒性を判断する基準として古くから用いられてきた(厚生省, 1983)。一方、近年のフグ需要の増大は漁獲海域の拡大と輸入を促すとともに、可食魚種やその部位も産地によって異なる毒性を示すとの報告が散見されるほか、毒性不明のフグ種が市場に出荷された例なども報告されている(加納ら, 1985a, 1985b; KODAMA, *et al.*, 1984; 遠藤, 1984; 加納ら, 1984b)。

フグ毒テトロドトキシン(以下、TTX と略記)は長年フグ科の魚類だけが保有するものと考えられてきたが、1964 年に両生類のカリフォルニアイモリ *Taricha torosa* (BROWN and MOSHER, 1964; MOSHER, *et al.*, 1964) から検出されたのをはじめとして、南西諸島等に生息する魚類のツムギハゼ *Yongeichthys criniger* (NOGUCHI, *et al.*, 1973)、コスタリカやパナマ産の小型カエル *Atelopus* spp. (KIM, *et al.*, 1975)、軟体動物のヒョウモンダコ *Hapalochlaena maculosa* (SHEUMACK, *et al.*, 1978)からもこの毒が分離された。1979 年には静岡県で巻貝ボウシュウボラ *Charonia sauliae* (NARITA, *et al.*, 1981) の摂食による重篤な食中毒が発生し、原因物質として TTX が同定された。ボウシュウボラによる食中毒は、1982 年に和歌山県で、1987 年には宮崎県でも発生している(丸山ら, 1983; 近藤ら, 1988)。

同じ肉食性巻貝類では、バイ *Babylonia japonica* (NOGUCHI, *et al.*, 1981)、オオナルトボラ *Tutufa lissostoma* (NOGUCHI, *et al.*, 1984)、ハナムシロガイ *Zeuxis siquijorensis* (NARITA, *et al.*, 1984)などからも TTX は検出されている。更に、棘皮動物門のヒトデ類、節足動物門のカニ類、扁形動物のヒラムシ類、環形動物のエラコ、紐形動物のヒモムシ類なども TTX を保有することが判明し、TTX はフグ以外の動物門にも広く分布していることが明らかになった (NOGUCHI, *et al.*, 1982, 1983; JEON, *et al.*, 1986; YASUMOTO, *et al.*, 1986; MIYAZAWA, *et al.*, 1988)。このように広範囲の生物が TTX を保有すること、また養殖フグは毒を保有しないなどの理由から、近年 TTX の真の生産者は細菌と考えられるようになった。事実、上記の TTX 保有動物の腸管から分離された *Vibrio alginolyticus* などの細菌で TTX 産生能が認められているが、フグの TTX 蓄積機構には未だ不明な点も多い (NOGUCHI, *et al.*, 1986; YASUMOTO, *et al.*, 1986; NARITA, *et al.*, 1987)。

一方、上記の厚生省通知フグ可食リストの例外として、有毒部位を用いた製品にもかかわらず食用が認められているものに石川県産「フグ卵巣の糠漬」と山口県産「ゴマフグの皮」がある (田口, 1984; 小沢, 1983a, 1983b, 1986)。これらの製品はいずれも塩蔵品で、通常少量しか摂食しないこと、製品をロット管理して安全性を確認しているなどの理由により、食用が許可されている。大分地方では、フグ料理専門店などにおいてトラフグの肝臓を独特の調理法で処理したものが「キモ料理」として長年提供されていたが、上述の厚生省通知により禁止された。しかし、有毒部位であるフグの肝臓を上記の卵巣や皮のように無毒化して利用できるならば、資源の有効活用になると考えられる。

TTX の検査法には、マウス毒性試験法が公定法として用いられている (厚生省, 1978)。しかし、この定量法はマウスを用いる生物試験法であるため飼育管理が必要で、測定誤差が大きく、TTX と他のマリントキシンを区別できないなどの短所が知られている。近年、公定法の短所を補う試験法として、化学的及び免疫学的方法が検討、提案されている (YASUMOTO, *et al.*, 1982;

ONOE, *et al.*, 1983; NAGASHIMA, *et al.*, 1987; MATSUMURA, 1995; KAWATSU, *et al.*, 1997)。しかし、免疫学的試験法は未だ汎用性に乏しく、また高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる化学分析法も試料の前処理法が煩雑で少量試料の検体には適用が難しい場合もあり、定量法としての問題点が未だ残されている。

本研究はこのような背景のもとに、前記の諸点に検討を加えたもので、フグ食中毒の防止とフグの有効利用を目的にした。本論文はその成果を取りまとめたもので全 5 章からなる。

第 1 章では、食中毒防止及び資源活用の観点から食中毒事例のあるフグ 2 種及び毒性不明のフグ 1 種の毒性について、またフグ毒化のバックグラウンドの観点からフグ毒保有動物の毒性について、それぞれ検討した。

ヒガンフグ *Takifugu pardalis* の筋肉摂食により食中毒死亡事故が発生した大分県国東沿岸産の同魚(46 個体)とコモンフグ *Takifugu poecilonotus* (34 個体)の毒性を検討した結果、ヒガンフグで 6.5% (最高毒力 55 MU/g)、コモンフグで 41.2% (同 84 MU/g) の個体の筋肉から 10 MU/g 以上の毒性を検出した。食用が不可とされる三陸沿岸産の両種フグより筋肉の平均毒性は低いものの、ヒガンフグは毒力の個体差が著しく、コモンフグは活魚でも有毒率が 19.0% と高いことから、国東沿岸産のものはいずれも食用に供せない魚種と結論した。また両種とも、皮膚、肝臓及び卵巣の毒力相互間に相関関係を認めた。

次に毒性不明魚種のホシフグ *Arothron firmamentum* (80 個体)について検討した結果、筋肉、精巣、肝臓が無毒、皮膚が弱毒(有毒個体出現率 12.5%、最高毒力 43 MU/g)、卵巣が強毒(同 80.5%、890 MU/g)、消化管が弱毒(同 1.3%、21 MU/g)であった。また豊後水道産 79 個体では、皮膚の有毒個体(弱毒)は 8 月と 10 月に検出され、卵巣は 5, 8, 10 月が強毒で推移したことから、本種の有毒部位は初夏から秋にかけて毒性が高いことが示唆された。しかし、豊後水道産のもの筋肉は季節変動もなく無毒で、食用が可能と判断された。

中腸腺にフグ毒が局在するとされる巻貝ボウシュウボラ *Charonia sauliae* (56 個体) 及びテングニシ *Pugilina (Hemifusus) ternatana* (23 個体) の中腸腺毒性を豊後水道産のものについて調べた結果、ボウシュウボラでは 64.3% の個体が有毒 (10 MU/g 以上) で、最高毒力 750 MU/g、最高毒量 55,000 MU に達した。これは食中毒事例のある静岡県・和歌山県産のものとは比べてやや低いか同程度で、同じく食中毒事例のある宮崎県産のものを上回る毒化状況を示していた。また、採取海域により毒化状況に差がみられた。他方、テングニシでは 26.1% の中腸腺から 2.6~8.7 MU/g の毒性を検出したが、谷 (1945) のフグの毒力表示では無毒に分類され、毒量の最高値は 96 MU であった。

第 2 章では、大分県のフグ料理専門店で、1983 年以前まで提供されていた伝統食品「キモ料理」の除毒効果と除毒メカニズムについて検討した。

大分県のフグ料理専門店及びフグ卸店に入荷した西日本近海産のトラフグ *Takifugu rubripes* (242 個体) 及びカラス *Takifugu chinensis* (50 個体) の肝臓毒性を調べた結果、トラフグの 17.8% (最高毒力 1,270 MU/g)、カラスの 12.0% (同 130 MU/g) の肝臓が有毒 (10 MU/g 以上) であった。トラフグでは、肝臓重量 200g 以上のものの方が 200g 未満のものより強毒性の傾向を示した。これらの有毒肝臓を用い、大分地方に伝わるフグ肝臓調理の一方法について除毒の効果を検討したところ、調理前毒力 62~1,270 MU/g の 21 例すべてが調理後には 5 MU/g 未満となり、厚生省の無毒基準 (10 MU/g 以上) を満足していた。この伝統調理法は大別すると細切・手揉み・煮沸の 3 調理工程から成っており、HPLC 分析等の結果から、手揉み工程はフグ毒の溶出除去により、煮沸工程は加熱により TTX がより弱毒なアンヒドロ-TTX (anh-TTX) へ、更に無毒なテトロドン酸 (TDA) へと順次構造変化することで減毒していくメカニズムが明らかになった。

第 3 章では、除毒によるフグ肝臓の利用について検討した。

トラフグの有毒肝臓抽出液を中性または pH 4 の酸性下で 30 分間直火または水浴加熱したときの減毒率は、中性液が直火加熱で 68.2%、水浴加熱で 43.2% に対し、酸性液が直火加熱で 25.8%、水浴加熱で 17.4% であった。また、TTX 標品水溶液及びトラフグの有毒肝臓を中性下オートクレーブで 120℃加熱すると、両者とも 100℃加熱より減毒率が著しかった。水溶液中のフグ毒は、加熱時の液性と温度によっては従来いわれているほど熱に安定でないことが分かった。

フグ肝臓調理法の煮沸工程における減毒傾向は、肝臓抽出液及び TTX 標品水溶液を中性下で直火加熱したときの減毒傾向とよく類似した。加熱 20 分を境として減毒率には違いがみられ、加熱 20 分までの方が 20 分以後より減毒率が高かった。その減毒傾向を調理除毒 11 例から求めた結果、加熱時間と毒力の関係は一次式に回帰され、除毒の推定式が算定された。調理除毒法においては、煮沸前の肝臓毒力を知ることにより、毒性消失までの煮沸時間を推定することも可能と考えられた。また、肝臓調理法について調理工程ごとの除毒効果を検討した結果、除毒には細切・手揉み・煮沸の 3 工程はいずれも不可欠で、“手揉み” 時間は 3 分間で十分なものの、“細切” はできるだけ小さくし、加熱は 100℃を超える温度で行うと更に高い除毒効果が得られた。有毒肝臓をオートクレーブで 120℃加熱すると、手揉みなしでも伝統的肝臓調理法の煮沸工程より短い加熱時間で同等に除毒された。

これらの結果から、缶詰加工技術などによる正確な温度管理や製品の毒性学的ロット管理など、食品としての安全性を確保する手段を講じることで、本来有毒部位であるフグの肝臓を有効利用できることが分かった。

第 4 章では、簡易なフグ毒検査法の確立とその汎用化について検討した。

フグ毒の定量は、マウス毒性試験法が公定法とされている。しかし、マウス管理の煩雑さや生物学的判定に伴う精度の問題などから化学的定量法の開発も試みられてきた。これらの方法では、一般に多量の試料と、かなり複雑な精製操作を必要とし、サンプル量が制限される食中毒時の検査や部位別の

検査、ルーチンの業務には適用が困難である。この点に留意して、HPLC を用いた簡便なフグ毒定量法の確立を試みた。

TTX はアルカリ存在下で加熱すると蛍光体化されるので、蛍光強度によって定量できる。TTX や関連物質の蛍光体化には、アルカリ濃度、加熱温度、反応時間の 3 者が関係するが、post-column derivatization 方式での蛍光体化条件については詳細な報告がなく、また加熱温度を 100℃以上にしたときの蛍光体化については不明であった。検討の結果、反応液の水酸化ナトリウム溶液を 3 規定から 4 規定にかえ、加熱温度を 100℃から 130℃に、反応コイルを 10 m から 15 m に伸ばして反応時間を延長することで、最適な蛍光体化条件が得られた。この条件での蛍光強度は、従来のものより約 10 倍向上した。

次に、簡便かつ迅速に検液を調製する目的でカートリッジカラムを用いたクリーンアップと濃縮操作を検討した。種々検討の結果、SEP-PAK C₁₈ カラムと BAKER 10-SPE™ スルホン酸型カラムを用いることで 0.1% 酢酸抽出液からのクリーンアップとフグ毒の濃縮が可能になった。この方法での濃縮効果は約 8 倍であった。

以上の検討から、魚貝類中のフグ毒を簡便かつ精度よく定量する HPLC 検査法を確立できた。本法はマウス毒性試験法の抽出液をそのまま用いることができ、TTX のみならず関連物質の組成分析も可能で、本法とマウス毒性試験法との測定値は相関係数 0.99 (n=10) でよく一致した。検出限界はフグ試料で 0.2 μg/g、巻貝試料で 0.5 μg/g であった。

この簡易な HPLC 検査法の実施例として、1988 年に大分県で発生したヒガンフグの筋肉摂食による死亡事件で原因の究明を行った。本法による分析の結果、患者の吐物と残品のヒガンフグ頭部の筋肉から TTX を検出した。同時に吐物からは、TTX のアンヒドロ体と体内での分解生成物と思われる未知成分のピークを検出し、この事件は TTX による食中毒と断定された。また、有毒肝臓中の毒の分布に違いがみられたトラフグ個体での検討では、肝臓の各部位ごとに HPLC 分析に供し、毒力の違いはフグ毒及び関連物質の成分組成

の違いに基づくことを明らかにした。例示のように検体が少量に制限されるケースでは、毒力と成分組成とを同時に簡便かつ精度よく分析できる本法は有用性が高いと考えられた。

最後に第5章では、以上の諸結果を中心に総合考察を行った。

なお、本論文の内容の主要部分は、下記のとおり公表済みである。

1. 局 伸男， 渕 祐一， 森崎澄江， 溝腰利男， 首藤真寿美， 藤井幹久， 山田謙吾， 林 薫： 有毒フグ肝臓の調理による除毒効果について． 食品衛生学雑誌， 27(5)， 561-564 (1986)．
2. 渕 祐一， 局 伸男， 森崎澄江， 溝腰利男， 首藤真寿美， 藤井幹久， 山田謙吾， 林 薫： トラフグとカラスの肝臓の毒力調査． 食品衛生学雑誌， 27(5)， 569-572 (1986)．
3. 渕 祐一， 局 伸男， 森崎澄江， 溝腰利男， 首藤真寿美， 藤井幹久， 山田謙吾， 林 薫： フグ毒の加熱による影響について． 食品衛生学雑誌， 27(5)， 573-577 (1986)．
4. 渕 祐一， 森崎澄江， 長田 忠， 嶋崎晃次， 野口玉雄， 大友信也， 橋本周久： 高速液体クロマトグラフィーによる魚貝類中のテトロドトキシンの定量． 食品衛生学雑誌， 29(5)， 306-312 (1988)．
5. 渕 祐一， 野口玉雄， 斉藤俊郎， 森崎澄江， 仲摩 聡， 嶋崎晃次， 林 薫， 大友信也， 橋本周久： フグ肝臓の伝統的調理における減毒機構． 食品衛生学雑誌， 29(5)， 320-324 (1988)．
6. 田島義久， 内山静夫， 井沢 堯， 仲摩 聡， 長田 忠， 渕 祐一， 麻生 篤： ヒガンフグによる食中毒とこれに伴う毒性調査について． 食品衛生研究， 41(1)， 97-103 (1991)．
7. 渕 祐一， 成松浩志， 仲摩 聡， 寿 久文， 平川英敏， 鳥島嘉明， 野口玉雄， 大友信也： ホシフグの部位別毒性． 食品衛生学雑誌， 32(6)， 520-524

(1991).

8. 渕 祐一, 帆足喜久雄, 赤枝 宏, 牧野芳大, 野口玉雄: 豊後水道産ホシフグの部位別及び季節別毒性, 食品衛生学雑誌, 39(6), 421-425 (1998).
9. 渕 祐一, 帆足喜久雄, 赤枝 宏, 牧野芳大, 野口玉雄: 大分県国東沿岸産ヒガンフグ及びコモnfグの毒性, 食品衛生学雑誌, 40(1). (印刷中).

第 1 章 西日本産フグ及びフグ毒保有動物の毒性

1983 年 12 月の厚生省通知「フグの衛生確保について」を契機として、フグによる食中毒は発生件数、患者数、死者数とも減少傾向にある(厚生省, 1983)。しかし、フグ中毒の致死率は依然として高く、1996 年には 広島県と長崎県で 3 名が死亡している(厚生省, 1997)。いずれも西日本地方産のフグによるものである。

ヒガンフグ *Takifugu pardalis* 及びコモンフグ *Takifugu poecilonotus* については、上記の通知により三陸沿岸産のものを除き、筋肉の摂食が認められている。1985～89 年にかけて大分県では、この 2 種のフグによる食中毒が各 2 件ずつ発生しており、合計の患者数は 7 名で、1988 年にはヒガンフグの筋肉摂食により 1 名が死亡している(大分県, 1998)。この死亡事例を含め、3 件が国東沿岸～別府湾産の両種によるもので、1 件が採取海域不明のコモンフグによる食中毒であった。本章の第 1 節と第 2 節では、過去に中毒事例のある大分県国東沿岸産ヒガンフグとコモンフグを対象に部位別及び季節別の毒性を調べて、両種フグの毒性の実態を把握し、食中毒の防止に資そうとした。

次に、第 3 節では毒性不明種のホシフグについて検討した。ホシフグの毒性については、多種類のフグの毒性を検討した谷(1945)の報告にもみあたらない。近年、資源を求めてフグ漁獲海域は益々拡大されており、未利用フグ種の毒性を明らかにすることは、食品衛生上のみならず未利用資源活用の上からも重要と思われる。

フジツガイ科の肉食性巻貝の一種であるボウシュウボラ *Charonia sauliae* による重篤な食中毒が 1979 年に静岡県で、1982 年に和歌山県で、1987 年には宮崎県でも発生し、その原因物質はいずれも中腸腺に局在する TTX であった(NARITA, *et al.*, 1981; 丸山ら, 1983; 近藤ら, 1988)。その後、バイ *Babylonia japonica* (NOGUCHI, *et al.*, 1981)、オオナルトボラ *Tutufa*

lissostoma (NOGUCHI, *et al.*, 1984)、ハナムシロガイ *Zeuxis siquijorensis* (NARITA, *et al.*, 1984) など数種類の肉食性巻貝類で TTX が見出された。フグは食物連鎖により毒化すると考えられており、ヒガンフグはハナムシロガイなどの小型巻貝や二枚貝、カニ類を多食することがその消化管内容物の調査で明らかになっている(野口, 1993; 桑原ら, 1983)。このような背景から、1983~85 年にかけて大分県沖の豊後水道で捕獲されるフグ以外で食習慣のある魚介類について毒性を調査した。その結果、ボウシュウボラ、テングニシの 2 種の巻貝及びスベスベマンジュウガニから TTX を検出した。本章の第 4 節では、フグ毒化のバックグラウンドを視点として、食中毒の未然防止を目的にフグ毒保有の可能性があるフグ以外の魚介類について毒性の把握を行った。

第1節 ヒガンフグ *Takifugu pardalis*

ヒガンフグ (Fig. I-1) は日本各地の沿岸、黄海、東シナ海に分布している全長 35cm に達する中型種である。皮膚に小さいイボ状の突起が密布し、茶褐色の地色に黒褐色の斑紋が特徴で、部位によって強い毒性をもち、中毒例もある。筋肉は従来無毒とされていたが、三陸沿岸産などで有毒個体が知られている。

北九州産の各種フグの毒性を広範に調査した谷 (1945) は、ヒガンフグの筋肉毒性について 49 個体すべてが無毒 (最高毒力 5 MU/g) と報告している。他方、三陸沿岸産以外の本種の筋肉毒性について、谷 (1945) と異なる報告も散見される (高久ら, 1976; 坪内ら, 1984; 遠藤ら, 1984)。

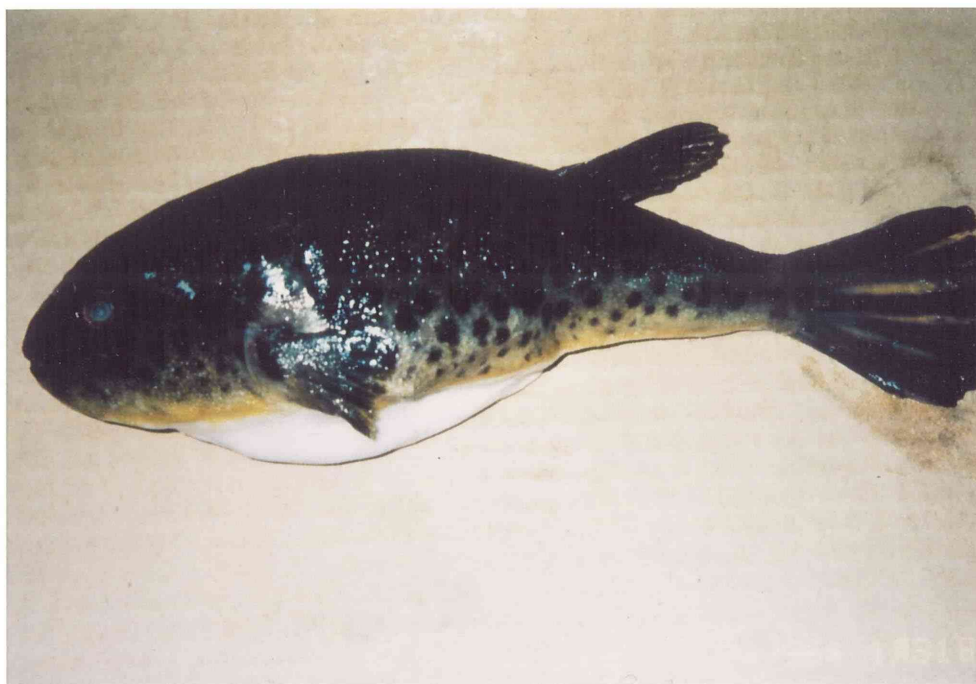


Fig. I-1. ヒガンフグ *Takifugu pardalis*.

試料及び方法

大分県国東沿岸産ヒガンフグの採取海域を Fig. I-2 に示した。試料には 1984 年 3 月から 1996 年 5 月までに漁獲された 46 個体(雄 24 個体、雌 21 個体、不明 1 個体)を用いた (Table I-1)。このうち、1984~89 年産のものは水揚げ後、直ちに凍結し、 -20°C で保存した。用時半解凍し、筋肉、皮膚、肝臓、生殖腺の各部位に分けて毒性試験に供したが、一部の試料は生殖腺の毒性を測定しなかった。1993~96 年産のものは水揚げ後、活魚のまま研究室に搬入し、上記の各部位と消化管、同内容物に分けて毒性試験に供した。毒性試験は、「食品衛生検査指針(理化学編)」中のフグ毒検査法(厚生省, 1991)に従って行った。毒力は谷(1945)の方法に従って評価し、無毒は 10 MU/g 未満、有毒は 10 MU/g 以上で、有毒のうち 10~100 MU/g 未満は弱毒、100~1,000 MU/g 未満は強毒、1,000 MU/g 以上は猛毒とした。

結果及び考察

1. 部位別の毒性

供試したヒガンフグ 46 個体の毒性試験結果を Table I-1 に示した。また、部位別にみた 10 MU/g 以上の有毒個体出現率(以下、単に有毒率と記す)、最高毒力及び平均毒力 \pm S.D. (標準偏差)を Table I-2 に示した。

検討した 6 部位の有毒率は、筋肉で 6.5% (供試 46 個体中 3 個体が有毒。以下、3/46 と記す)、皮膚で 91.3% (42/46)、肝臓で 78.3% (36/46)、精巢で 5.9% (1/17)、卵巢で 80.0% (12/15)、消化管で 50.0% (11/22)、同内容物で 40.9% (9/22)を示した。このうち、筋肉は雌の方が雄より毒性が強い傾向を示し、生殖腺では雌の方が強毒性を示す性差が認められた。各部位の最高毒力を谷(1945)の表示で示すと、筋肉が弱毒、肝臓と卵巢が猛毒、他の部位はすべて強毒で、平均毒力は筋肉が無毒、皮膚・肝臓・卵巢が強毒、他の部位はいずれも弱毒であった。これを北九州産同魚の毒性に関する谷

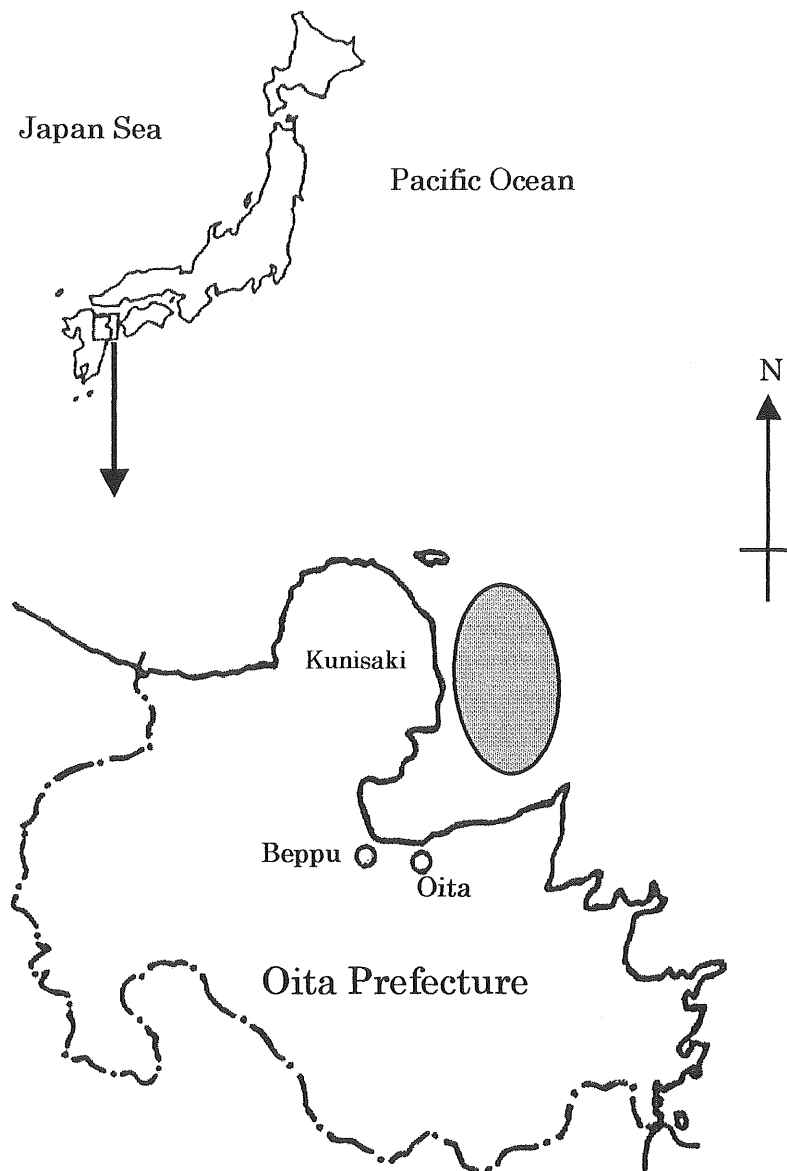


Fig. I -2. A map showing Kunisaki coast, Oita Prefecture, where specimens of “Higanfugu” and “Komonfugu” were collected.

Table I -1. Anatomical distribution of toxicity of a puffer fish, "Higanfugu" specimens collected from Kunisaki coast during March 1984 to May 1996

No.	Date	Body weight (g)	Body length (cm)	Sex	Toxicity(MU/g)						
					Muscle	Skin	Liver	Gonad		Intestine	Digestive c. contents *1
								Testis	Ovary		
1	Mar., '84	227	20.5	♀	< 3	11	24		< 3	—*3	—*3
2	Oct., '88	262	22.0	♂	< 3	14	3.9	—*3		—*3	—*3
3		211	20.5	♂	8.5	46	83	—*3		—*3	—*3
4		210	20.5	♂	< 3	31	< 3	—*3		—*3	—*3
5		233	23.0	♀	3.0	200	350		—*3	—*3	—*3
6		231	22.0	♀	< 3	89	110		—*3	—*3	—*3
7		179	20.0	♀	4.1	230	2,200		—*3	—*3	—*3
8		83	16.0	♀	3.0	37	22		—*3	—*3	—*3
9		201	20.5	—*2	< 3	22	16			—*3	—*3
10	Nov., '88	300	24.0	♂	< 3	50	73	—*3		—*3	—*3
11		219	20.0	♂	< 3	33	41	—*3		—*3	—*3
12		217	22.0	♀	7.0	290	430		—*3	—*3	—*3
13	Dec., '88	218	21.0	♂	5.0	61	31	—*3		—*3	—*3
14		214	21.0	♂	< 3	40	2,200	—*3		—*3	—*3
15	Mar., '89	254	23.0	♀	55	220	1,000		1,300	—*3	—*3
16	Apr., '89	294	27.0	♂	4.3	74	38	280		—*3	—*3
17		203	20.0	♂	< 3	9.8	5.3	< 3		—*3	—*3
18		150	16.0	♂	< 3	360	31	< 3		—*3	—*3
19		109	16.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 3		—*3	—*3
20		308	23.0	♀	< 3	97	5.3		330	—*3	—*3
21		295	21.0	♀	< 3	49	39		120	—*3	—*3
22		273	22.0	♀	< 3	110	130		—*3	—*3	—*3
23		269	22.0	♀	< 3	50	40		130	—*3	—*3
24	July., '89	253	23.0	♀	12	310	400		290	—*3	—*3
25	Apr., '93	340	24.5	♂	< 5	47	35	< 5		22	< 5
26		300	23.5	♂	< 5	290	180	< 5		72	17
27		270	23.0	♂	< 5	260	170	< 5		68	15
28		237	22.0	♂	< 5	52	20	< 5		< 5	< 5
29		220	22.0	♂	< 5	17	11	< 5		< 5	< 5
30		191	21.0	♂	< 5	16	40	< 5		< 5	< 5
31		298	23.5	♀	< 5	31	6.7		110	5.0	< 10
32		264	24.0	♀	< 5	83	16		54	< 5	< 5
33		260	23.0	♀	12	370	1,900		750	390	440
34		185	20.0	♀	< 5	17	< 5		170	< 5	< 5
35		151	20.0	♀	< 5	6.6	< 5		< 5	< 5	< 10
36	May, '93	296	25.0	♂	< 5	140	180	< 5		50	97
37		215	22.5	♂	< 5	8.7	< 5	< 5		< 5	< 10
38		202	21.0	♂	7.0	500	1,100	< 5		250	170
39		193	21.5	♂	< 5	92	62	< 5		16	27
40		167	21.0	♂	< 5	120	14	< 5		< 5	< 5
41		111	19.0	♂	< 5	120	55	< 5		17	11
42		278	23.5	♀	< 5	350	120		350	22	6.7
43		193	22.5	♀	< 5	15	7.1		35	< 5	< 5
44		166	21.0	♀	< 5	99	150		< 5	34	13
45		118	19.0	♀	< 5	360	320		13	140	92
46	May, '96	86	16.5	♂	< 5	24	17	< 5		< 5	< 5

*1 Digestive canal contents.

*2 Unidentified specimen.

*3 Not tested.

Table I -2. Summary on anatomical distribution of toxicity of a puffer fish, "Higanfugu" specimens tested

	Sex	Frequency of toxic ^{*1} specimens(%)	No. of toxic ^{*1} specimens				Toxicity(MU/g)	
			≥1,000MU/g	100~ < 1,000MU/g	10~ < 100MU/g	< 10 MU/g	Maximum	Mean ^{*2} ±S.D.
Muscle	Male	0 (0/24) ^{*4}	0	0	0	24	8.5	1.0±2.5
	Female	14.3(3/21)	0	0	3	18	55	4.6±12
	Total ^{*3}	6.5(3/46)	0	0	3	43	55	2.6±8.5
Skin	Male	87.5(21/24)	0	7	14	3	500	100±130
	Female	95.2(20/21)	0	9	11	1	370	140±130
	Total ^{*3}	91.3(42/46)	0	16	26	4	500	120±130
Liver	Male	79.2(19/24)	2	3	14	5	2,200	180±480
	Female	76.2(16/21)	3	8	5	5	2,200	350±620
	Total ^{*3}	78.3(36/46)	5	11	20	10	2,200	250±540
Gonad	Testis	5.9(1/17)	0	1	0	16	280	16±68
	Ovary	80.0(12/15)	1	8	3	3	1,300	240±350
Intestine	Male	53.8(7/13)	0	1	6	6	250	38±69
	Female	44.4(4/ 9)	0	2	2	5	390	66±130
	Total	50.0(11/22)	0	3	8	11	390	49±97
Digestive canal contents	Male	46.2(6/13)	0	1	5	7	170	26±51
	Female	33.3(3/ 9)	0	1	2	6	440	61±150
	Total	40.9(9/22)	0	2	7	13	440	40±99
	Sex	n=	Body weight(g)		Body length(cm)			
			Range	Mean±S.D.		Range	Mean±S.D.	
	Male	24	86-340	217±64		16.0-27.0	21.3±2.7	
	Female	21	83-308	226±61		16.0-24.0	21.6±1.9	
	Total ^{*3}	46	83-340	221±62		16.0-27.0	21.4±2.3	

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Calculated on the assumption that the toxicity score of nontoxic specimens was zero.

^{*3} One unidentified specimen included.

^{*4} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

Table I-3. Correlation coefficient (r) of toxicity between each organ and others in a puffer fish, "Higanfugu" specimens tested

Organs	Skin	Liver	Ovary	Intestine	D.c.contents ^a
Skin	1				
Liver	0.44 ^{**}	1			
Ovary	0.47 ^b	0.74 ^{**^b}	1		
Intestine	0.77 ^{***^c}	0.98 ^{***^c}	0.80 ^{***^d}	1	
D.c.contents ^a	0.61 ^{**^c}	0.97 ^{***^c}	0.85 ^{**^d}	0.95 ^{***^c}	1

^a Digestive canal contents, ^b n=15, ^c n=22, ^d n=9.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

(1945)の結果と比較すると、無毒とされている筋肉が弱毒を、弱毒とされる精巣が強毒を示した点が異なっていた。

Table I-3 に各部位の毒力相互間の関係を示した。このうち、皮膚・肝臓・消化管・消化管内容物の毒力相互の間には相関関係が認められ、その相関係数は 0.44~0.98 ($p<0.01\sim<0.001$)と算定された。また、卵巣と肝臓・消化管・消化管内容物の毒力間にも相関関係がみられた ($r=0.74\sim0.85$, $p<0.01\sim<0.001$)。他方、筋肉と精巣は毒性が低く、他の部位との相関関係がみられなかった(表示せず)。

関連して、加納ら(1984b)はヒガンフグの肝臓・胆汁・消化管内容物の毒力相互の関係を調べ、フグ体内でのフグ毒の排泄ルートを推定している。著者らの結果でも、肝臓・消化管・同内容物の3部位毒力間の相関係数は $r=0.95\sim0.98$ ($p<0.001$)で極めて高く、これら3部位と他の部位との毒力相互間よりも密接な関係がうかがわれ、毒性上の関連性が示唆された。

2. 季節別の毒性

Fig. I-3 に季節別の毒性について検討した結果を示した。筋肉の最高毒力は3月に採取した 55 MU/g の個体(雌)で、4月と7月にも弱毒個体(いずれも雌の 12 MU/g)がみられ、他の4採取月は無毒(5.0~8.5 MU/g)であった。

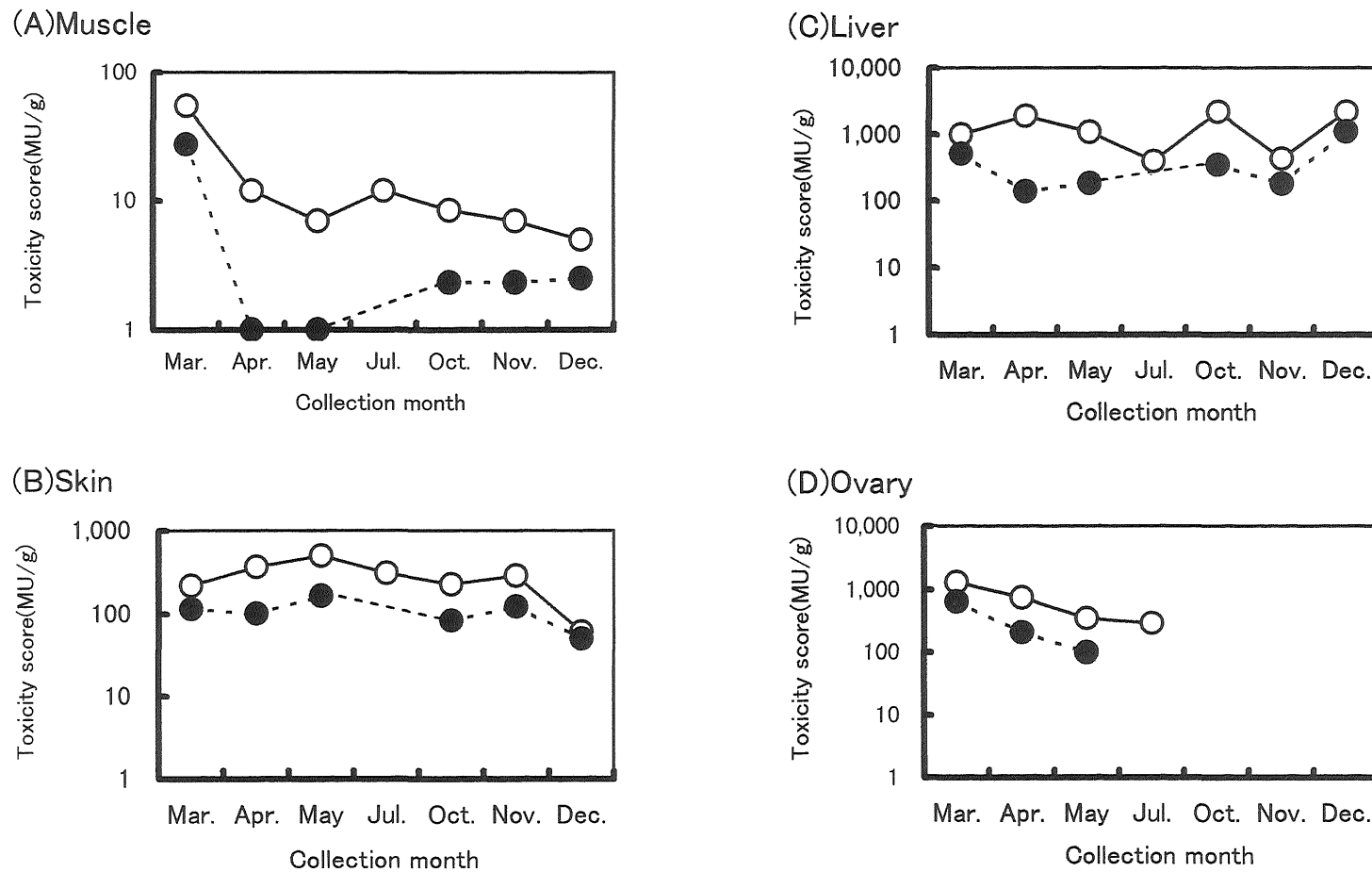


Fig. 1-3. Seasonal variation of toxicity of various organs in a puffer fish, "Higanfugu" specimens collected from Kunisaki coast.
 Symbols: ○, maximum; ●, mean.

平均毒力は 3 月が弱毒 (28 MU/g) を示し、他の採取月 (<1~2.5 MU/g) と比較して高かった。

一方、皮膚の最高毒力は 5 月に採取した 500 MU/g の個体 (雄) で、12 月の弱毒 (61 MU/g) を除き各月とも強毒 (220~500 MU/g) であった。平均毒力は 10 月と 12 月が弱毒 (84 MU/g と 51 MU/g) で、他の月はすべて強毒 (100~170 MU/g) を示した。

肝臓の最高毒力は 10 月と 12 月に採取したいずれも 2,200 MU/g の個体 (雌と雄) で、7 月と 11 月の強毒 (400 MU/g と 430 MU/g) を除き各月とも猛毒 (1,000~2,200 MU/g) であった。平均毒力は 12 月が猛毒 (1,100 MU/g) で、他の月はすべて強毒 (140~510 MU/g) を示した。

卵巣の最高毒力は 3 月に採取した 1,300 MU/g の個体で、他の 3 採取月とも強毒 (290~750 MU/g) であった。平均毒力は、3~5 月とも強毒 (100~650 MU/g) を示した。また、精巣は 4 月に採取した 280 MU/g の 1 個体だけが強毒で、他の個体はすべて無毒であった (図示せず)。

谷 (1945) は、日本近海産フグの各組織の毒性は抱卵期から産卵期にかけて増強すると報告している。上記のヒガンフグの毒性推移では、筋肉と肝臓の平均毒力が晩秋から春先にかけて高くなる傾向がうかがえた。しかし、筋肉の秋季の平均毒力は極めて低く、両部位の最高毒力の推移にはこの傾向がみられなかった。また、皮膚では一定の季節的消長が認められず、生殖腺は採取月が少なく季節的消長が明らかでなかった。

3. 国東沿岸産ヒガンフグの毒性の評価

ヒガンフグの筋肉毒性について、谷 (1945) は北九州産 49 個体すべてが無毒 (最高毒力 5 MU/g)、高久ら (1985) は東京卸売市場入荷 10 個体の有毒率 20% (最高毒力 16 MU/g、平均毒力 2.8 MU/g)、坪内ら (1984) は名古屋市卸売市場入荷 49 個体の有毒率 4.1% (最高毒力 60 MU/g、平均毒力 1.6 MU/g)、遠藤ら (1984) は山口県産 89 個体の有毒率 24.7% (最高毒力 120 MU/g)、加納ら (1984a) は三陸沿岸産 86 個体の有毒率 68.6% (最高毒力 200 MU/g、平均毒力

20 MU/g)、KODAMA ら(1984)は三陸沿岸産 85 個体の有毒率 22.4%(最高毒力 40 MU/g)とそれぞれ報告している。

国東沿岸産同魚の結果は北九州産より高い毒性であるが、山口県産・三陸沿岸産より明らかに低い毒性で、東京及び名古屋卸売市場のものとほぼ同程度の毒性を示した(Table I-2)。また、1988 年にヒガンフグ筋肉による食中毒死亡事故が発生した 9 月前後の季節で、筋肉の毒性に顕著な変化が認められなかったことから、同死亡事故は稀に出現する強毒性の個体によるものと推察され、漁獲時期との関連性はないと考えられた(Fig. I-3)。

以上の検討から、国東沿岸産ヒガンフグの筋肉は、三陸沿岸を除く他の海域産のものと比較して特に高い毒性とはいえない。しかし、ヒガンフグの筋肉毒性は個体差が著しいこと、過去に筋肉による食中毒死亡事故が発生していることから、食用に供するには食品衛生上検討を要するフグと考えられた。

第2節 コモンフグ *Takifugu poecilonotus*

コモンフグ (Fig. I-4) は北海道以南の日本各地の沿岸、沖縄、韓国沿岸に分布している全長 25cm の小型種である。茶褐色の地色に淡色のほぼ丸い小点が特徴で、背ひれ、臀ひれは黄色または黄桃色で、背面と腹面に小棘がある。筋肉は弱毒、他の部位の多くは強い毒性をもち、中毒例もある。三陸沿岸産では筋肉で強毒の個体が知られている。

北九州産の各種フグの毒性を広範に調査した谷 (1945) は、コモンフグ 34 個体の筋肉の有毒率が 11.8% (最高毒力 20 MU/g、平均毒力 2.4 MU/g) と報告している。他方、三陸沿岸産以外の本種の筋肉毒性についても谷 (1945) と異なる報告が散見される (遠藤ら 1984; 野中ら, 1996)。

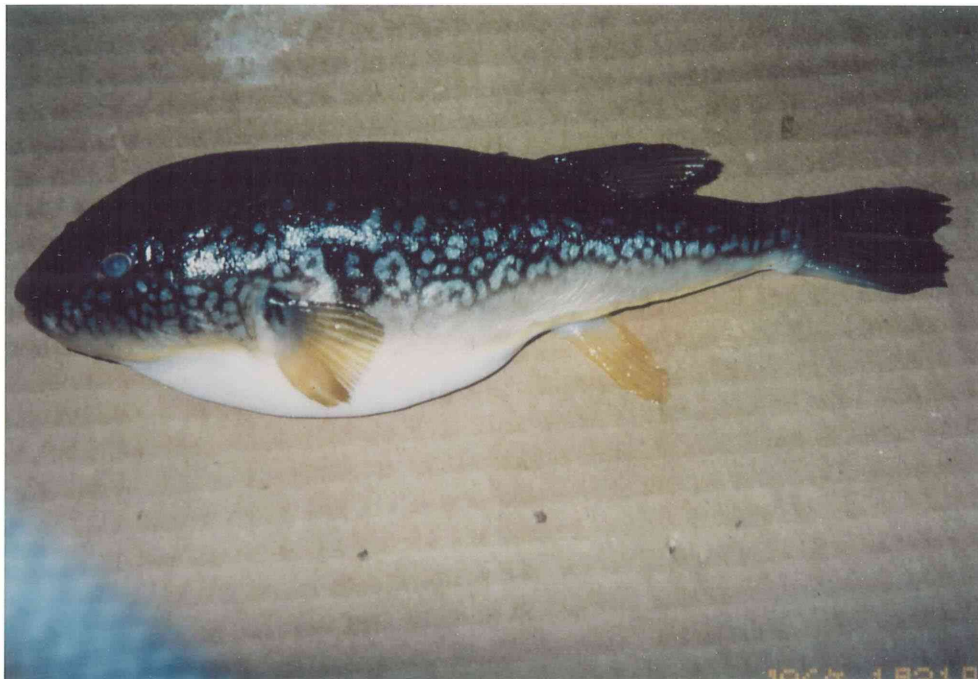


Fig. I-4. コモンフグ *Takifugu poecilonotus*.

試料及び方法

大分県国東沿岸産コモングの採取海域は、第 1 節中の Fig. I-2 に示した。試料には 1983 年 6 月から 1996 年 5 月までに漁獲された 34 個体(雄 11 個体、雌 18 個体、不明 5 個体)を用いた(Table I-4)。このうち、1983~90 年産のものは水揚げ後、直ちに凍結し、-20℃で保存した。用時半解凍し、筋肉、皮膚、肝臓、生殖腺の各部位に分けて毒性試験に供したが、一部の試料は生殖腺の毒性を測定しなかった。1995~96 年産のものは水揚げ後、活魚のまま研究室に搬入し、上記の各部位に分けて毒性試験に供した。毒性試験は、「食品衛生検査指針(理化学編)」中のフグ毒検査法(厚生省, 1991)に従って行った。毒力は谷(1945)の方法に従って評価し、無毒は 10 MU/g 未満、有毒は 10 MU/g 以上で、有毒のうち 10~100 MU/g 未満は弱毒、100~1,000 MU/g 未満は強毒、1,000 MU/g 以上は猛毒とした。

結果及び考察

1. 部位別の毒性

供試したコモング 34 個体の毒性試験結果を Table I-4 に、部位別にみた 10 MU/g 以上の有毒個体出現率(以下、単に有毒率と記す)、最高毒力及び平均毒力±S.D. を Table I-5 に示した。

各部位の有毒率は、筋肉で 41.2% (14/34)、皮膚で 100% (34/34)、肝臓で 82.4% (28/34)、精巣で 72.2% (8/11)、卵巣で 100% (18/18)を示した。筋肉では、雌の方が雄に比して強い毒性を示す性差が認められた。各部位の最高毒力は筋肉が弱毒、精巣が強毒、皮膚・肝臓・卵巣が猛毒で、平均毒力は筋肉が弱毒、他の部位が強毒であった。この結果は、北九州産同魚の毒性に関する谷(1945)の結果と概ね一致したが、筋肉の有毒率及び最高毒力値は高かった。

Table I-6 では、各部位の毒力相互間の関係をみた。皮膚・肝臓・卵巣

Table I -4. Anatomical distribution of toxicity of a puffer fish,
"Komonfugu" specimens collected from Kunisaki coast
during June 1983 to May 1996

No.	Date	Body weight (g)	Body length (cm)	Sex	Toxicity (MU/g)				
					Muscle	Skin	Liver	Gonad	
								Testis	Ovary
1	Jun., '83	154	16.5	♀	81	250	300		37
2	Feb., '85	102	16.0	♀	84	1,500	570		980
3		89	16.0	♀	30	420	640		61
4	Sep., '88	231	23.5	—* ¹	42	420	21		
5		210	23.0	—* ¹	30	270	49		
6		202	23.5	—* ¹	39	150	36		
7		168	17.0	—* ¹	67	550	87		
8		162	16.5	—* ¹	51	360	89		
9	Apr., '89	315	25.0	♂	3.4	540	63	950	
10	Jun., '89	274	24.0	♂	5.6	980	53	510	
11	Sep., '89	350	26.0	♀	10	1,300	2,900		1,200
12	Apr., '90	33	12.0	♂	11	13	170	56	
13	May, '90	78	15.5	♀	4.0	160	73		240
14	Sep., '95	210	17.5	♂	< 3	150	20	5.0	
15		180	18.0	♂	< 3	89	9.4	280	
16		225	21.0	♀	13	230	73		1,200
17		211	17.5	♀	4.6	240	9.6		240
18	Dec., '95	225	19.5	♂	3.3	330	450	130	
19		242	19.5	♀	6.7	920	2,100		1,800
20		207	18.0	♀	6.0	100	< 5		180
21		191	16.5	♀	5.5	300	65		660
22		185	17.5	♀	24	900	1,000		2,200
23	May, '96	140	15.5	♂	< 3	36	5.4	48	
24		139	15.5	♂	3.3	210	450	130	
25		126	16.0	♂	< 3	120	140	< 5	
26		109	15.0	♂	5.4	130	250	17	
27		107	17.5	♂	< 3	1,000	140	< 5	
28		163	19.5	♀	< 3	310	52		1,200
29		160	17.5	♀	15	130	170		1,000
30		155	16.5	♀	13	170	130		600
31		125	16.0	♀	< 3	140	5.7		130
32		110	15.5	♀	7.3	300	340		620
33		107	15.0	♀	< 3	27	< 5		110
34		81	15.0	♀	< 3	230	38		280

*¹ Unidentified specimen.

Table I -5. Summary on anatomical distribution of toxicity of a puffer fish, "Komonfugu" specimens tested

	Sex	Frequency of toxic ^{*1} specimens(%)	No. of toxic ^{*1} specimens				Toxicity(MU/g)	
			≥1,000MU/g	100~ < 1,000MU/g	10~ < 100MU/g	< 10 MU/g	Maximum	Mean ^{*2} ±S.D
Muscle	Male	9.1(1/11) ^{*4}	0	0	1	10	11	3.0±3.3
	Female	44.4(8/18)	0	0	8	10	84	17±25
	Total ^{*3}	41.2(14/34)	0	0	14	20	84	17±24
Skin	Male	100 (11/11)	1	7	3	0	1,000	330±340
	Female	100 (18/18)	2	15	1	0	1,500	420±430
	Total ^{*3}	100 (34/34)	3	27	4	0	1,500	380±370
Liver	Male	81.8(9/11)	0	6	3	2	450	160±150
	Female	77.8(14/18)	3	6	5	4	2,900	470±800
	Total ^{*3}	82.4(28/34)	3	12	13	6	2,900	310±610
Gonad	Testis	72.7(8/11)	0	5	3	3	950	190±280
	Ovary	100 (18/18)	6	10	2	0	2,200	710±630
	Sex	n=	Body weight(g)		Body length(cm)			
			Range	Mean±S.D.	Range	Mean±S.D.		
	Male	11	33-315	169±82	12.0-25.0	17.8±3.7		
	Female	18	78-350	163±69	15.0-26.0	17.5±2.7		
	Total ^{*3}	34	33-350	170±69	12.0-26.0	18.1±3.3		

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Calculated on the assumption that the toxicity score of nontoxic specimens was zero.

^{*3} Five unidentified specimens included.

^{*4} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

Table I -6. Correlation coefficient (r) of toxicity between each organ and others in a puffer fish, "Komonfugu" specimens tested

Organs		Muscle	Skin	Liver	Gonads	
					Testis	Ovary
Muscle		1				
Skin		0.39	1			
Liver		0.02	0.63***	1		
Gonads	Testis	0.09 ^a	0.40 ^a	- 0.25 ^a	1	
	Ovary	- 0.01 ^b	0.60** ^b	0.55* ^b	-	1

^a n=11, ^b n=18.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

の毒力相互間の相関係数は 0.55~0.63 ($p<0.05\sim<0.001$)と算定され、相関関係が認められた。ヒガンフグと同様にコモンフグでも、皮膚と肝臓、両者と卵巣との間で毒性上の関連性が示唆された。他方、筋肉・精巣と他の部位との毒力相互間には、相関関係が認められなかった($r=-0.25\sim0.40$)。

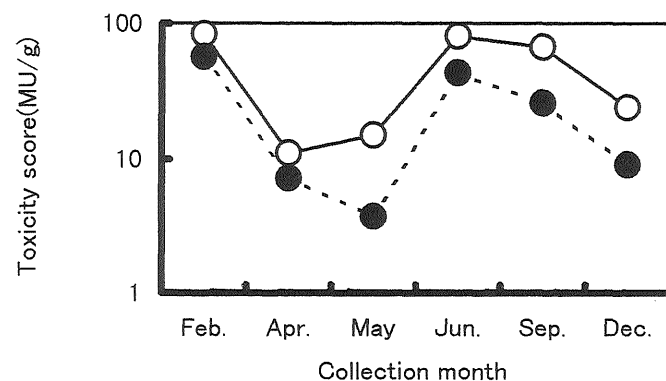
2. 季節別の毒性

コモンフグの各部位について季節別毒性を検討し、結果を Fig. I-5 に示した。筋肉の最高毒力は 2 月に採取した 84 MU/g の個体(雌)で、10 MU/g 以上の有毒個体は他の 5 採取月でもみられ、すべて弱毒(11~81 MU/g)であった。平均毒力は 2 月(57 MU/g)、6 月(43 MU/g)、9 月(26 MU/g)が弱毒で、他の各月が無毒(3.7~9.1 MU/g)を示した。

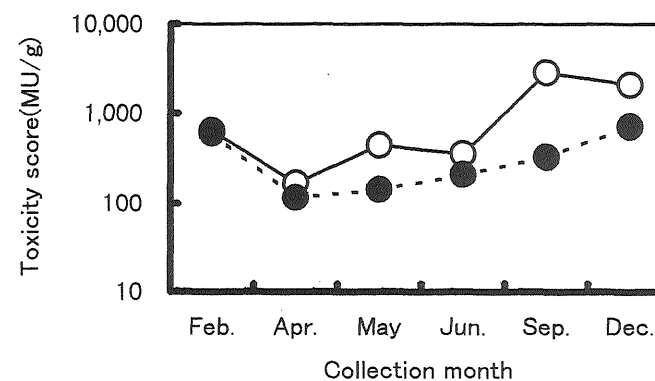
皮膚の最高毒力は 2 月に採取した 1,500 MU/g の個体(雌)で、他の各月も強毒及び猛毒(540~1,300 MU/g)を示し、平均毒力は各月とも強毒(230~960 MU/g)であった。肝臓では、最高毒力は 9 月に採取した 2,900 MU/g の個体(雌)で、2 月及び 4~6 月が強毒(170~640 MU/g)、12 月が猛毒(2,100 MU/g)で、平均毒力は各月とも強毒(120~720 MU/g)を示した。

生殖腺では、卵巣の最高毒力は 12 月の 2,200 MU/g で、5 月と 9 月も猛毒(いずれも 1,200 MU/g)を示し、2 月が強毒(980 MU/g)、6 月が弱毒(37 MU/g)

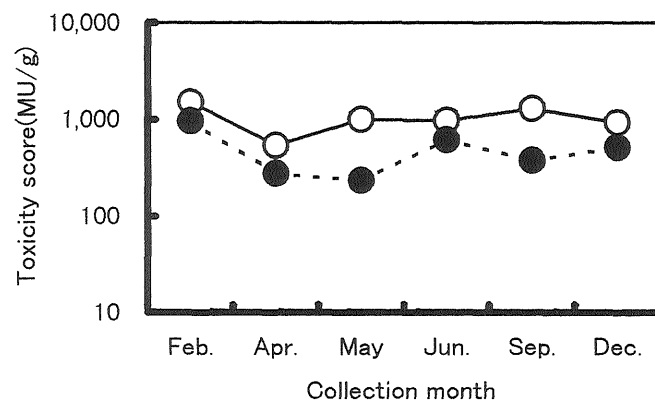
(A) Muscle



(C) Liver



(B) Skin



(D) Ovary (○, ●), Testis (△, ▲)

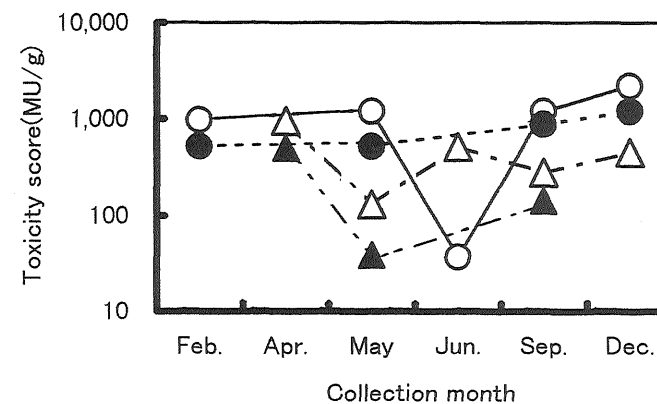


Fig. I-5. Seasonal variation of toxicity of various organs in a puffer fish, "Komonfugu" specimens collected from Kunisaki coast.

Symbols: ○ and △, maximum; ● and ▲, mean.

であった。平均毒力は 12 月が猛毒(1,200 MU/g)で、他の 3 採取月はいずれも強毒(520~880 MU/g)を示した。精巢の最高毒力は 4 月の 950 MU/g で、他の 4 採取月はいずれも強毒(130~510 MU/g)であった。平均毒力は 4 月と 9 月が強毒(500 MU/g と 140 MU/g)で、5 月が弱毒(39 MU/g)を示した。

以上の結果からは、秋から冬にかけて肝臓の毒性が増強する傾向がうかがえた。しかし、他の部位では一定の季節的消長が明らかでなかった。

3. 国東沿岸産コモングの毒性の評価

コモングの筋肉の毒性について、谷(1945)は北九州産 34 個体の有毒率 11.8% (最高毒力 20 MU/g、平均毒力 2.4 MU/g)、遠藤(1984)は山口県産 114 個体の有毒率 36.0% (最高毒力 150 MU/g)、KODAMA ら(1984)は三陸沿岸産 57 個体の有毒率 75.4% (最高毒力 350 MU/g)、長田ら(1996)は長崎県産 34 個体の有毒率 2.9% (最高毒力 20 MU/g、平均毒力 1.7 MU/g)、とそれぞれ報告している。国東沿岸産同魚の結果は、長崎県産や北九州産より高い毒性を示したが、三陸沿岸産より明らかに低い毒性で、山口県産のものとほぼ同程度の毒性と考えられた(Table I-5)。また、長田ら(1996)によれば活魚と冷凍魚を比較すると、活魚の方が毒性は低い傾向がみられたという。関連して冷凍ナシフグ等では、解凍時に有毒部位からの毒の移行が知られている(塩見ら, 1984, 1985; 原田と内田, 1996; NOGUCHI *et al.*, 1997)。ナシフグと同様に皮膚の毒性が高いコモングでは、解凍時にフグ毒が筋肉へ移行することもあると考えられる。そこで、活魚で検討した 1995~96 年産コモング 21 個体について筋肉毒性をみたが、有毒率 19.0% (4/21)、最高毒力 24 MU/g、平均毒力 5.1 ± 6.4 MU/g で、長崎県産より毒性は高く北九州産と同程度の毒性を示した。

以上の検討から、国東沿岸産コモングの筋肉は、三陸沿岸を除く他の海域産のものと比較して特に高い毒性とはいえない。しかし、活魚でも有毒個体の出現頻度が 19.0%を示すことから、食用に供するには食品衛生上検討を要するフグと考えられた。

第3節 ホシフグ *Arothron firmamentum*

ホシフグ (Fig. I-6) は、本州中部以南、東シナ海、南シナ海に分布している全長 40cm に達する中型種である。地色は黒紫色で、背面や体側に白点、全身に小棘がみられる。ホシフグの毒性については、多種類のフグの毒性を検討した谷 (1945) の報告にもみあたらない。

大分県南沖の豊後水道では、夏から秋にかけて、本種がまき網漁で時に大量に漁獲されることがある。また、九州周辺海域で漁獲された同魚が、魚市場に出荷された例もいくつか報告されている。しかし、ホシフグは毒性不明として厚生省通知のフグの食用リスト (厚生省, 1983) から除外されているためすべて廃棄されている。本節では、豊後水道及び山口県沖で漁獲されたホシフグについて、これまで明らかにされていない部位別及び季節別の毒性を調べて、毒性不明フグ種の利用を検討した。

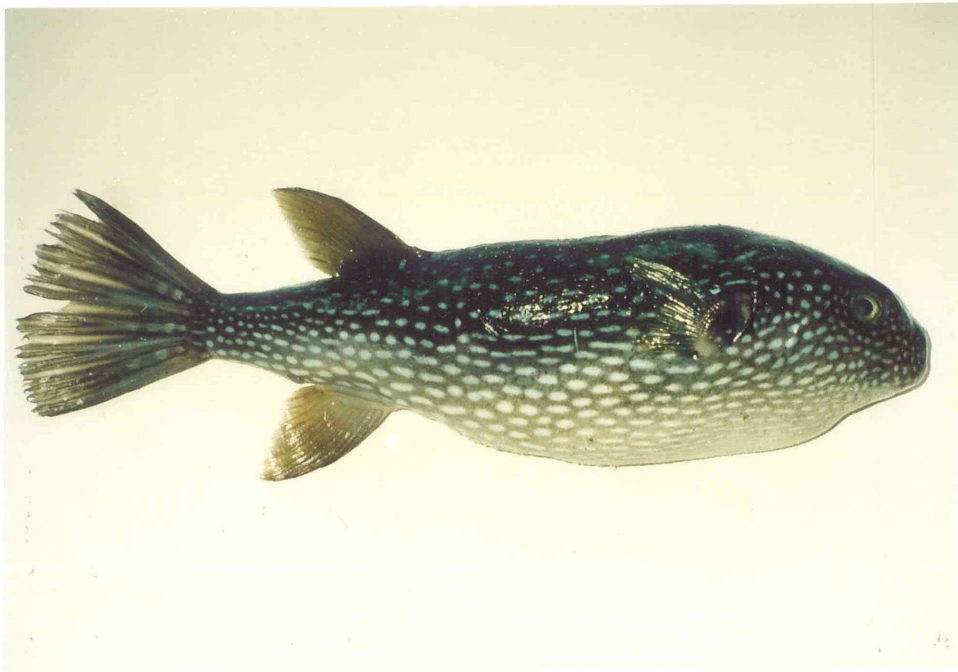


Fig. I-6. ホシフグ *Arothron firmamentum*.

試料及び方法

1. 試料

試料には、1990 年 10 月から 1997 年 3 月までに大分県南沖の豊後水道で漁獲された 79 個体(雄 39 個体、雌 40 個体)と 1990 年 12 月に山口県下関市近海で漁獲された 1 個体の計 80 個体を用いた(Table I-7)。豊後水道産ホシフグの採取海域を Fig. I-7 に示した。いずれも水揚げ後、直ちに凍結し -20℃で保存した。用時半解凍し、筋肉、皮膚、肝臓、生殖巣、腸管の 5 部位に分けて毒性試験に供した。また、1990 年採取の豊後水道産のものについては、有毒及び無毒の計 5 個体につき、消化管内容物の鑑別同定並びに同管内細菌の分離同定を行った。

2. 毒性試験

毒性試験は、「食品衛生検査指針(理化学編)」中のフグ毒検査法(厚生省, 1991)に準じて行った。また、一部の個体については、毒性試験の抽出試料を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析(第 4 章)に供して、TTX 等の確認を行った。毒力は谷(1945)の方法に従って評価し、無毒は 10 MU/g 未満、有毒は 10 MU/g 以上で、有毒のうち 10~100 MU/g 未満は弱毒、100~1,000 MU/g 未満は強毒、1,000 MU/g 以上は猛毒とした。

3. 消化管内容物の鑑別同定

有毒 4 個体(No. 24、No. 27、No. 29、No. 30)及び無毒 1 個体(No. 2)の計 5 個体の消化管内容物を、実体顕微鏡による鏡検法で調べた。

4. 細菌検査

有毒個体(No. 18、No. 20、No. 25)と無毒個体(No. 7、No. 10)の計 5 個体について、「食品衛生検査指針(微生物編)」中の細菌検査法(厚生省, 1990)に準じて消化管内の細菌の分離同定を行った。

結果及び考察

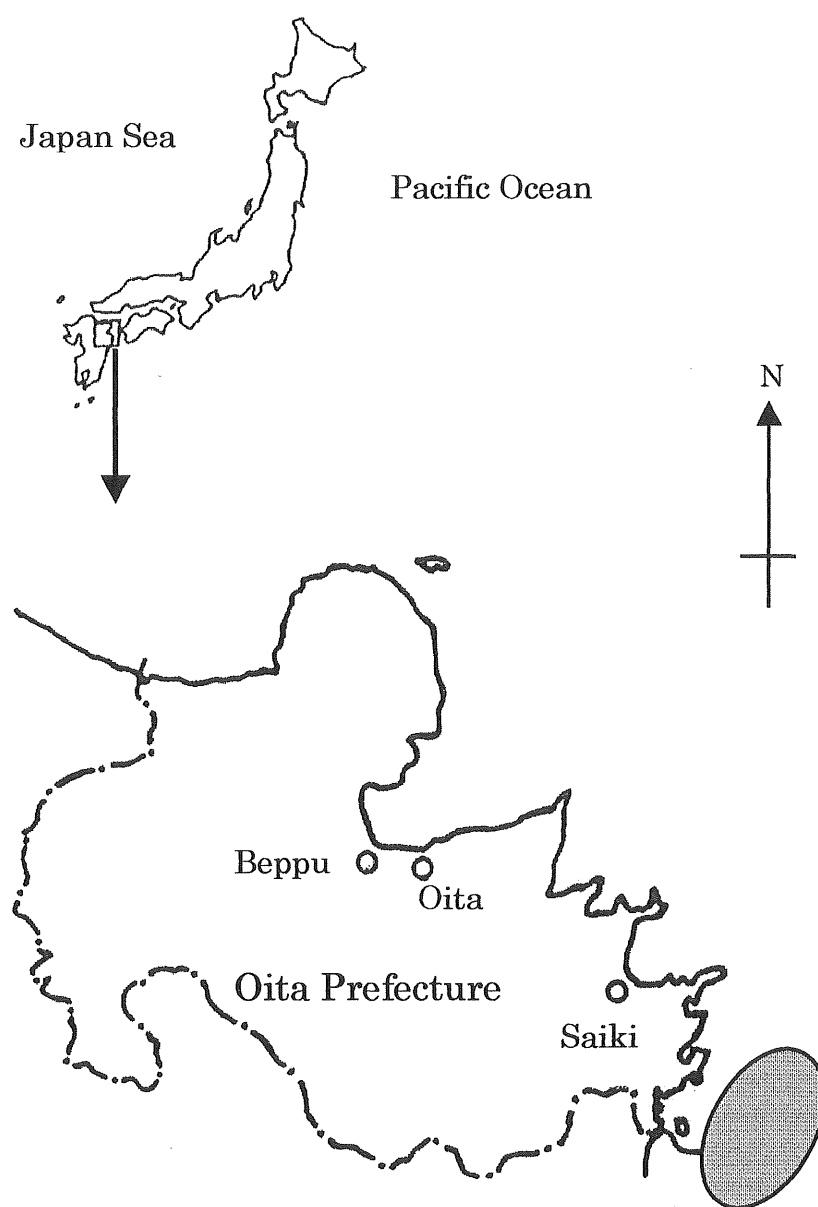


Fig. I -7. A map showing Bungo Channel where specimens of “Hoshifugu” were collected.

Table I -7. Anatomical distribution of toxicity of a puffer fish, "Hoshifugu" specimens collected from Bungo Channel, Oita during 1990 to 1997, and coast of Yamaguchi in 1990

No.	Collection place	Collection month	Specimen No.	Body weight (g)	Body length (cm)	Sex	Toxicity(MU/g)					
							Muscle	Skin	Liver	Gonad		Intestine
										Testis	Ovary	
1	Oita	Oct., '90	1	386	28.0	♂	< 3	8.6	< 3	< 5		< 3
2			2	281	23.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
3			3	244	24.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
4			4	262	24.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
5			5	315	26.0	♂	< 3	7.9	< 3	< 5		< 3
6			6	270	24.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
7			7	338	24.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
8			8	271	24.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
9			9	302	26.0	♂	< 3	18	< 3	< 5		< 3
10			10	312	26.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
11			11	343	28.0	♂	< 3	5.9	< 3	< 5		< 3
12			12	330	26.0	♂	< 3	7.7	< 3	< 5		< 3
13			13	327	26.5	♂	< 3	31	< 3	< 5		< 3
14			14	276	25.5	♂	< 3	8.8	< 3	< 5		< 3
15			15	350	27.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
16			16	317	26.0	♂	< 3	7.3	< 3	< 5		< 3
17			17	302	26.5	♀	< 3	< 3	< 3		19	< 3
18			18	331	25.0	♀	< 3	17	< 3		210	< 3
19			19	252	24.0	♀	< 3	3.1	< 3		38	< 3
20			20	280	25.0	♀	< 3	3.1	< 3		330	< 3
21			21	387	27.0	♀	< 3	4.3	< 3		< 5	< 3
22			22	306	24.5	♀	< 3	< 3	< 3		77	< 3
23			23	277	23.0	♀	< 3	< 3	< 3		34	< 3
24			24	359	28.0	♀	< 3	19	< 3		85	< 3
25			25	321	26.5	♀	< 3	6.4	< 3		150	< 3
26			26	336	27.0	♀	< 3	13	< 3		< 5	< 3
27			27	316	26.0	♀	< 3	7.3	< 3		21	< 3
28			28	325	26.0	♀	< 3	< 3	< 3		< 5	< 3
29			29	297	25.5	♀	< 3	4.8	< 3		67	< 3
30			30	345	27.5	♀	3.0	37	< 3		310	4.2
31	Yamaguchi	Dec., '90	1	1,220	39.0	♀	6.1	44	6.8		890	21
32	Oita	Aug., '91	1	423	28.5	♂	< 3	8.6	< 3	< 5		< 3
33			2	419	28.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
34			3	409	26.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
35			4	399	26.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
36			5	378	26.0	♂	< 3	7.9	< 3	< 5		< 3
37			6	277	25.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
38			7	983	37.0	♀	< 3	9.2	< 3		110	< 3
39			8	422	28.0	♀	< 3	16	< 3		640	< 3
40			9	395	27.0	♀	< 3	4.8	< 3		210	< 3
41			10	380	27.0	♀	< 3	14	< 3		230	< 3
42			11	323	25.5	♀	< 3	3.8	< 3		65	< 3
43	Oita	May, '95	1	173	21.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
44			2	145	20.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
45			3	289	24.0	♀	< 3	< 3	< 3		190	< 3
46	Oita	Oct., '95	1	642	31.5	♀	< 3	29	< 3		370	< 3
47	Oita	Nov., '95	1	343	27.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
48			2	322	26.5	♂	< 3	3.4	< 3	< 5		< 3
49			3	311	26.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
50			4	310	26.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
51			5	287	25.5	♂	< 3	3.9	< 3	< 5		< 3
52			6	275	25.0	♂	< 3	5.7	< 3	< 5		< 3
53			7	271	26.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5		< 3
54			8	252	24.5	♂	< 3	4.1	< 3	< 5		< 3
55			9	209	23.5	♂	< 3	3.1	< 3	< 5		< 3

Table I -7. (continued)

No.	Collection place	Collection month	Specimen No.	Body weight (g)	Body length (cm)	Sex	Toxicity(MU/g)				
							Muscle	Skin	Liver	Gonad Testis Ovary	Intestine
56			10	330	27.0	♀	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
57			11	322	26.5	♀	< 3	< 3	< 3	3.5	< 3
58			12	309	27.0	♀	< 3	< 3	< 3	87	< 3
59			13	306	26.5	♀	< 3	< 3	< 3	31	< 3
60			14	298	26.5	♀	< 3	< 3	< 3	35	< 3
61			15	298	26.0	♀	< 3	3.8	< 3	97	< 3
62			16	294	26.0	♀	< 3	< 3	< 3	39	< 3
63			17	293	26.0	♀	< 3	3.4	< 3	61	< 3
64			18	289	25.5	♀	< 3	5.1	< 3	58	< 3
65			19	286	26.0	♀	< 3	< 3	< 3	42	< 3
66			20	277	24.5	♀	< 3	< 3	< 3	3.5	< 3
67			21	208	23.5	♀	< 3	3.1	< 3	84	< 3
68	Oita	Mar., '96	1	177	21.0	♀	< 3	4.2	< 3	< 3	< 3
69	Oita	Sep., '96	1	236	24.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5	< 3
70			2	219	23.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5	< 3
71			3	213	22.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5	< 3
72			4	208	22.5	♂	< 3	< 3	< 3	< 5	< 3
73			5	204	22.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5	< 3
74			6	352	29.0	♀	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
75			7	223	23.0	♀	< 3	< 3	< 3	120	< 3
76			8	217	22.5	♀	< 3	< 3	< 3	47	< 3
77			9	208	22.0	♀	< 3	< 3	< 3	68	< 3
78			10	197	22.5	♀	< 3	< 3	< 3	19	< 3
79	Oita	Mar., '97	1	204	22.0	♂	< 3	< 3	< 3	< 5	< 3
80			2	167	20.5	♀	< 3	< 3	< 3	16	< 3

Table I -8. Summary on anatomical distribution of toxicity of a puffer fish, "Hoshifugu" specimens collected from Bungo channel, Oita

Organ	Sex	Frequency of toxic specimens(%)	Toxicity(MU/g)	
			Maximum	Mean ^{*2} ± S.D.
Muscle	Male	0/39 ^{*3} (0)	< 3	< 3
	Female	0/40 (0)	3.0	< 3
	Total	0/79 (0)	3.0	< 3
Skin	Male	2/39 (5.1)	31	3.4 ± 6.1
	Female	7/40 (17.5)	37	5.3 ± 8.3
	Total	9/79 (11.4)	37	4.3 ± 7.3
Liver	Male	0/39 (0)	< 3	< 3
	Female	0/40 (0)	< 3	< 3
	Total	0/79 (0)	< 3	< 3
Gonad	Testis	0/39 (0)	< 5	< 5
	Ovary	32/40 (80.0)	640	99 ± 130
	Total	32/79 (40.5)	640	50 ± 100
Intestine	Male	0/39 (0)	< 3	< 3
	Female	0/40 (0)	4.2	< 3
	Total	0/79 (0)	4.2	< 3

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Calculated on the assumption that the toxicity score of nontoxic specimens was zero.

^{*3} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

1. 豊後水道産個体の部位別毒性

大分県豊後水道産 79 個体の毒性試験の結果を Table I-7 に、また部位別にみた 10 MU/g 以上の有毒個体出現率、最高及び平均毒力 \pm S.D. を Table I-8 に示した。

1. 1 筋肉

雌の 1 個体から 3 MU/g のごく弱い毒力を検出したが、残りの 78 個体は 3 MU/g 未満で、谷(1945)による毒力の分類に従えば、すべて無毒であった。

1. 2 皮膚

全体としての有毒個体出現率は 11.4% (供試 79 個体中、9 個体が有毒。以下、9/79 と記す) であった。雌雄別の同出現率では、雄が 5.1% (2/39)、雌が 17.5% (7/40) で、雌の方が高い傾向を示した。しかし最高及び平均毒力は、雄が 31 MU/g 及び 3.4 ± 6.1 MU/g、雌が 37 MU/g 及び 5.3 ± 8.3 MU/g で特に顕著な差は認められず、谷(1945)の毒力分類に従うと雌雄とも弱毒と考えられた。

1. 3 肝臓

供試した 79 個体すべてが 3 MU/g 未満で無毒であった。

1. 4 生殖腺

精巣は、39 個体すべてが 5 MU/g 未満で無毒であった。一方、卵巣は有毒個体出現率が 80.0% (32/40) と高く、強毒が 27.5% (11/40)、弱毒が 52.5% (21/40) で、最高及び平均毒力は 640 MU/g 及び 99 ± 130 MU/g を示した。Fig. I-8 に卵巣の HPLC 分析例を示した。TTX 及びその関連物質のピークが検出され、有毒部位の毒はフグ毒であることが確認された。

1. 5 腸管

雌の 1 個体から 4.2 MU/g の弱い毒力を検出したが、他の 78 個体は 3 MU/g 未満で、谷の毒力分類に従うとすべて無毒に分類された。

1. 6 部位相互間の毒力の相関

毒性が検出された皮膚と卵巣について、雌 40 個体の毒力の関係を Fig. I-9 に示した。相関係数(r)は、0.608 ($p < 0.001$)と算定され、両者には相関

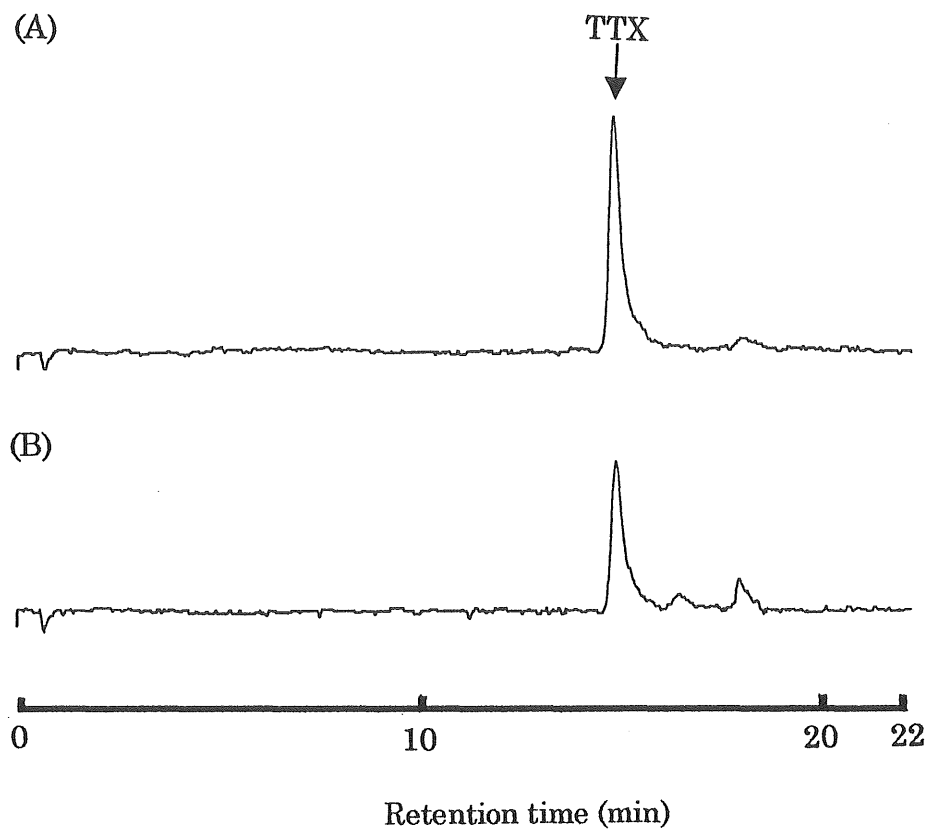


Fig. I -8. HPLC profiles of a toxic puffer fish, "Hoshifugu" ovary toxin (B) and TTX standard (A).

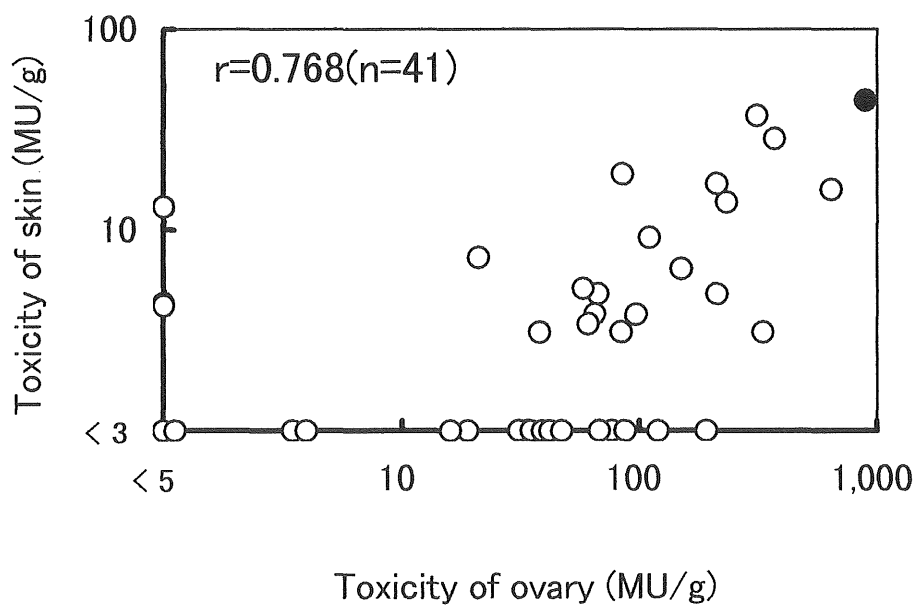


Fig. I -9. Correlation between toxicity of ovary and those of skin found in a puffer fish, "Hoshifugu".
O, collected from Oita; ●, collected from Yamaguchi.

関係が認められた。ホシフグの皮膚と卵巣の毒性には、関連性のあることが推察された。

1. 7 消化管内容物の鑑別同定

有毒(No. 27、No. 29、No. 30)及び無毒(No. 2)の計4個体の消化管内容物中に、翼足目の浮遊小貝類(ヒラカメガイ、マルカメガイ、ササノツユ)が多数認められた。このほか個体によっては、カニ類、エビ類、シャコ類の幼体もみられたが、フグの毒化との関連が明らかな有毒小型巻貝(NARITA, *et al.*, 1984)等は確認できなかった。

1. 8 消化管内細菌の分離同定

毒性との関係を調べる目的で細菌の分離同定を行った。No. 18の有毒個体から *Vibrio* sp. を、No. 7の個体(無毒)から *Vibrio damsela* を、No. 10の個体(無毒)から *Bacillus* sp. を、それぞれ分離した。これらの菌がフグ毒産生(SIMIDU, *et al.*, 1987)に参与しているかどうかについては、検討しなかった。

2. 豊後水道産個体の季節別毒性

フグの毒性は、同一種においても個体別、地域別並びに季節別に相違があることが知られている(谷, 1945)。Table I-9には、毒性が検出された皮膚及び生殖腺の漁獲月別の毒性結果を示した。6漁獲月のうち、皮膚では8月と10月に有毒個体がみられた。一方、卵巣ではすべての漁獲月で有毒個体が検出され、その出現率も50~100%(平均80%)と高かった。

Fig. I-10には皮膚及び卵巣毒力について、漁獲月別の最高値と平均値を示した。皮膚は毒性が低く、季節的変化が明確でなかった。他方、卵巣では、最高毒力は5~10月の4漁獲月が強毒(120~640 MU/g)で、3月と11月が弱毒(16 MU/gと97 MU/g)を示した。平均毒力は8月が250 MU/gで最も高く、10月、9月、11月がこれに次ぎ、3月が最も低かった。月別毒性の推移から、本種の卵巣は初夏から秋にかけて毒性の高いことが示唆された。

日本近海産フグの卵巣毒性は抱卵の頃から急激に増加し、産卵まで高い毒

Table I -9. Seasonal variation of toxicities of skin and gonad of a puffer fish, "Hoshifugu" specimens collected from Oita

Organ	Sex	Frequency of toxic ^{*1} specimens (%) in each month of collection							
		Mar.		May		Aug.		Sep.	
Skin	Male	0/1 ^{*2}	(0)	0/2	(0)	0/ 6	(0)	0/ 5	(0)
	Female	0/2	(0)	0/1	(0)	2/ 5	(40)	0/ 5	(0)
	Total	0/3	(0)	0/3	(0)	2/11	(18)	0/10	(0)
Gonad	Testis	0/1	(0)	0/2	(0)	0/ 6	(0)	0/ 5	(0)
	Ovary	1/2	(50)	1/1	(100)	5/ 5	(100)	4/ 5	(80)
	Total	1/3	(33)	1/3	(33)	5/11	(45)	4/10	(40)

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

性が維持されて、トラフグやクサフグの卵巣では 12 月から 5 月頃までの季節で毒性が高いと考えられてきた(谷, 1945; 清水ら, 1984)。一方、ショウサイフグやマフグでは、むしろ夏から秋にかけて卵巣が高い毒性を示すとの報告(加納ら, 1985; 橋本ら, 1988)もある。また、肝臓毒性の季節変化は卵巣のそれとは異なるとも言われ(谷, 1945)、フグの毒性と産卵期との関係は必ずしも明らかでない。フグ種による相違のほか、漁獲海域や個体差による影響も考えられるが、フグの毒性と産卵期の関係については更に検討する必要があると思われる。

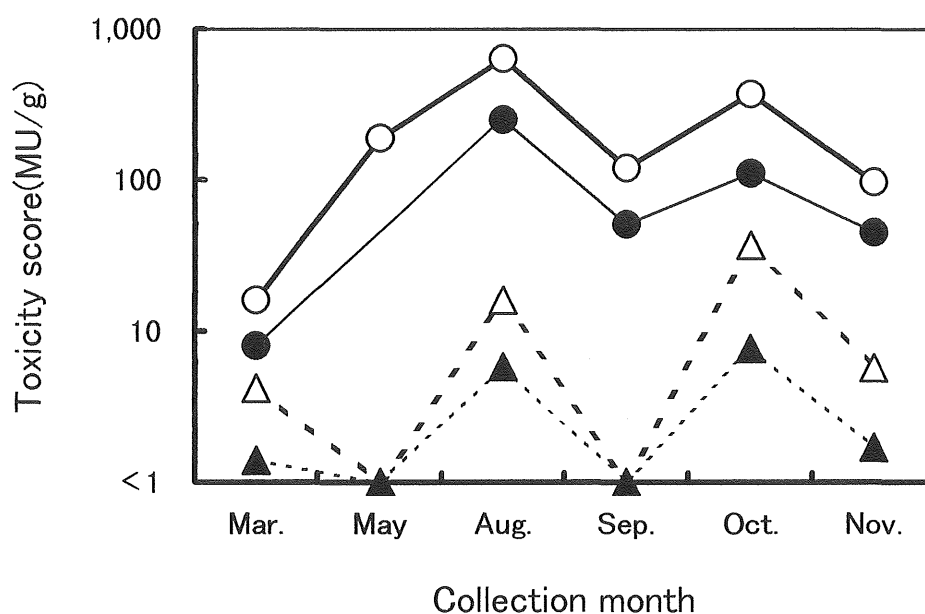


Fig. I -10. Seasonal variation of toxicities of skin and ovary of a puffer fish, "Hoshifugu" specimens collected from Oita.

○—○, maximal toxicity of ovary; ●—●, mean toxicity of ovary;
 △···△, maximal toxicity of skin; ▲···▲, mean toxicity of skin.

3. 山口県産個体の部位別毒性

山口県下関市近海産ホシフグ 1 個体(雌)の部位別毒性を Table I-7 に併記した。これを豊後水道産の部位別毒性と比較すると、山口県産の方がいずれの部位も高毒力を示したものの、谷(1945)の毒力分類に従うと、筋肉及び肝臓が無毒、皮膚及び腸管が弱毒、卵巣が強毒で、腸管以外は豊後水道産同魚の結果と一致していた。

また、部位相互間の毒力の関係についてみると、卵巣毒力が高いほど他の部位の毒力も強まることが推察された。特に皮膚と卵巣との関係では、豊後水道産 40 個体にこの 1 個体を加えたときの相関係数は 0.768 ($p<0.001$)と算定され、高い相関関係が推察された(Fig. I-9)。

4. ホシフグの毒性の評価

Table I-10 に豊後水道産と山口県産を併せ、検討したホシフグ 80 個体の部位別の毒性結果を示した。10 MU/g 以上の毒力を示した有毒部位は、皮膚が弱毒(有毒率 12.5%、最高毒力 43 MU/g、平均毒力 4.8 ± 8.5 MU/g)、卵巣が強毒(同 80.5%、890 MU/g、 120 ± 180 MU/g)、消化管が弱毒(同 1.3%、21 MU/g、3 MU/g 未満)であった。

以上の検討結果から、これまで毒性が不明とされてきたホシフグは筋肉、精巣、肝臓が無毒、皮膚と腸管が弱毒、卵巣が強毒の有毒種であることが明らかになった。本種は本州中部以南に分布し、全長 40 cm に達する中型種であるが、これまでに豊後水道産で検討した個体は体長 20~37 cm (平均 25.5 ± 2.5 cm)、体重 145~983 g (平均 308 ± 107 g)とやや小ぶりであった。豊後水道では、本種の漁獲時期は夏から晩秋に限られ、これまでもこの程度の大きさしか漁獲されていない。このことから、豊後水道で漁獲されるホシフグの筋肉は、季節的変化もなく無毒で、食用が可能と判断された。また、既報も含めてこれまで本種の肝臓からは 10 MU/g を超える毒性は検出されておらず、フグとしては特異な種と思われる。

Table I -10. Summary on anatomical distribution of toxicity of a puffer fish, "Hoshifugu" specimens tested

Organ	Sex	Frequency of toxic ^{*1} specimens(%)	Toxicity(MU/g)	
			Maximum	Mean ^{*2} ±S.D.
Muscle	Male	0/39 ^{*3} (0)	< 3	< 3
	Female	0/41 (0)	6.1	< 3
	Total	0/80 (0)	6.1	< 3
Skin	Male	2/39 (5.1)	31	3.5±6.0
	Female	8/41 (19.5)	43	6.2±10
	Total	10/80 (12.5)	43	4.8±8.5
Liver	Male	0/39 (0)	< 3	< 3
	Female	0/41 (0)	6.8	< 3
	Total	0/80 (0)	6.8	< 3
Gonad	Testis	0/39 (0)	< 5	< 5
	Ovary	33/41 (80.5)	890	120±180
	Total	33/80 (41.3)	890	61±140
Intestine	Male	0/39 (0)	< 3	< 3
	Female	1/41 (2.4)	21	< 3
	Total	1/80 (1.3)	21	< 3

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Calculated on the assumption that the toxicity score of nontoxic specimens was zero.

^{*3} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

第4節 フグ毒保有動物

近年、貝類を中心としてフグ毒及び貝毒による魚介類の毒化が全国各地で確認され、食品衛生上のみならず漁業経済上からも重要な問題となっている。また、フグは主に食物連鎖により毒化すると考えられており、フグの毒化とフグ毒保有動物との関係が指摘されている(野口, 1993; 桑原ら, 1983)。このような背景から、毒化の実態を把握し食中毒を未然に防止する目的で、大分県沖の豊後水道においてフグ以外の魚介類の毒性を調べた。その結果、ボウシュウボラ *Charonia sauliae*、テングニシ *Pugilina (Hemifusus) ternatana* の2種の巻貝及びスベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus* から TTX を検出した。本節ではボウシュウボラ (Fig. I-11) を中心に記述する。



Fig. I-11. ボウシュウボラ *Charonia sauliae*.

試料及び方法

1983 年 12 月から 1985 年 6 月にかけて、Fig. I-12 に示す大分県中部～南部海域 (A～G) で採取した巻貝、二枚貝及びカニを試料とした。貝類のうち、バテイラ (巻貝) は内臓部分を試料としたが、他はいずれも中腸腺を試料とした。またカニ類のうち、スベスベマンジュウガニでは付属肢および頭胸部外骨格を試料としたが、他はいずれも全体を試料とした。毒性試験は、巻貝及びカニでは「食品衛生検査指針Ⅱ」中のフグ毒検査法 (厚生省, 1978) 及び毒性スクリーニング法 (名取, 1977) に従って行った。毒力は谷 (1945) のフグ毒の表示に従って評価し、無毒は 10 MU/g 未満、有毒は 10 MU/g 以上で、有毒のうち 10～100 MU/g 未満は弱毒、100～1,000 MU/g 未満は強毒、1,000 MU/g 以上は猛毒とした。

結果及び考察

調査した巻貝 10 種 116 検体、二枚貝 1 種 16 検体、カニ 4 種 17 検体のうちで、ボウシュウボラを除く結果を Table I-11 に示した。ボウシュウボラの結果は、Table I-12 及び Table I-13 に示した。このうち、食習慣のあるものは巻貝 9 種、二枚貝 1 種、カニ 2 種である。以下、毒性を検出したボウシュウボラ、テングニシ (以上、巻貝) 及びスベスベマンジュウガニの 3 種について述べる。ボウシュウボラ等が保有する毒は、HPLC 分析の結果 (第 4 章第 2 節の Fig. IV-6 参照) 及び既報 (丸山ら, 1983; 橋本, 1988; 近藤ら, 1988) から TTX と考えられた。

1. ボウシュウボラの毒性

56 個体中 52 個体 (92.9%) の中腸腺から、5 MU/g 以上の毒性を検出した。毒力の最高値は 750 MU/g で平均値は 59 ± 110 MU/g、毒量の最高値は 55,000 MU で平均値は $2,000 \pm 7,600$ MU であった。毒力を谷 (1945) のフグの毒力表示に

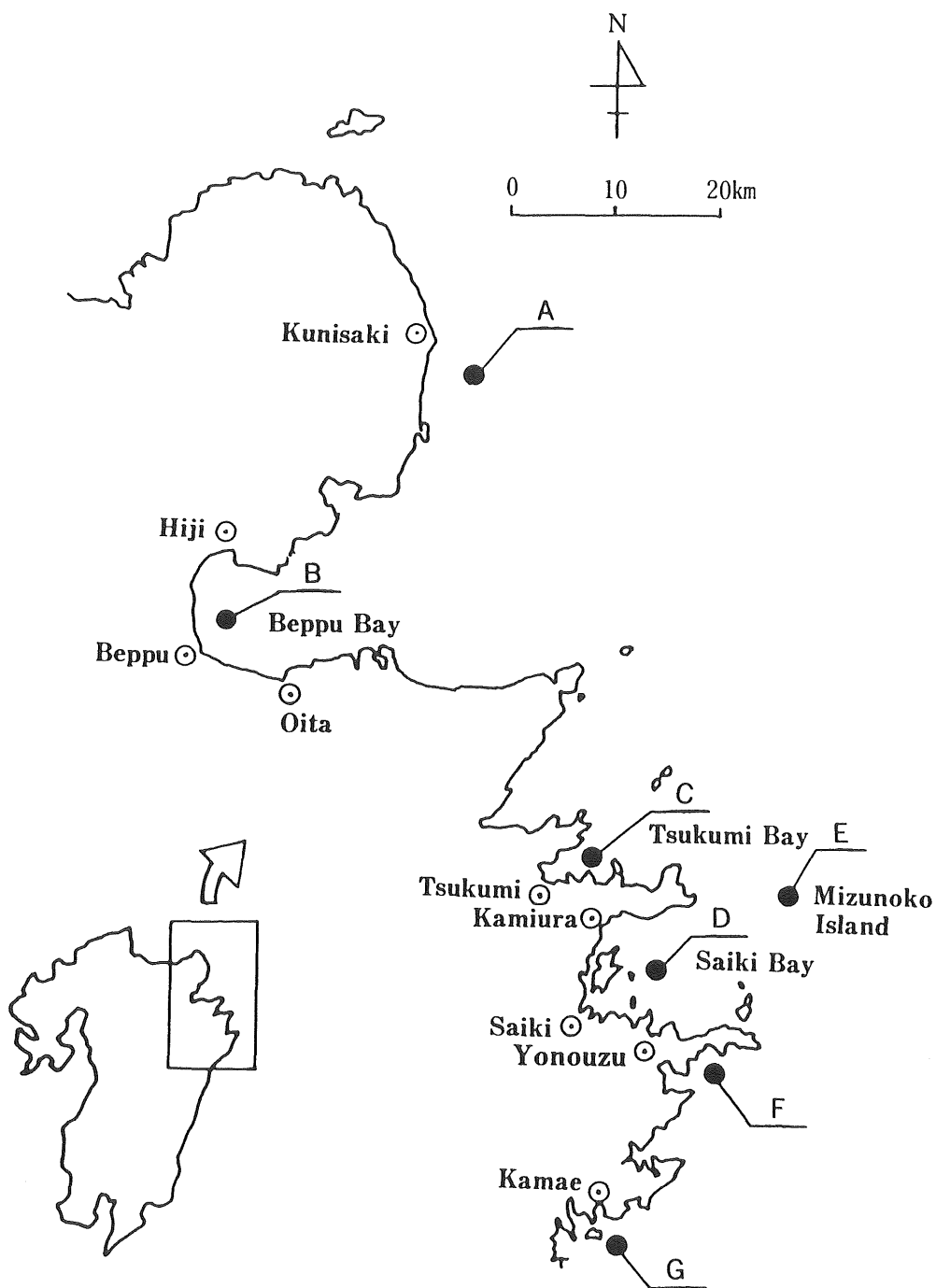


Fig. I -12. A map showing the sampling places of marine products (A-G).

Table I -11. Toxicity of marine products collected from several places in Oita Prefecture

Species	Date	Place	Specimens ^{*1}	Maximum toxicity	
				MU/g	MU
"Tengunishi", <i>Pugilina (Hemifusus) ternatana</i> ^{*2}	Sep. 1984	G	3/10	6.5	66
	Oct. 1984	UK ^{*3}	2/10	8.7	96
	Apr. 1985	D	1/3	2.6	27
"Yatushirogai", <i>Tonna luteostoma</i> ^{*2}	Aug. 1984	G	0/1	< 3	—
	Aug. 1984	F	0/2	< 3	—
	Apr. 1985	D	0/5	< 3	—
	May. 1985	B	0/5	< 3	—
"Bateira", <i>Omphalius pfeifferi</i> ^{*2}	Sep. 1984	G	0/1	< 3	—
"Naganishi", <i>Fusinus perplexus</i> ^{*2}	Apr. 1985	D	0/10	< 3	—
"Sazae", <i>Turbo (Batillus) cornutus</i> ^{*2}	Apr. 1985	D	0/5	< 3	—
"Onisazae", <i>Chicoreus asianus</i> ^{*2}	Jun. 1985	D	0/4	< 4	—
"Migakibora", <i>Kelletia lischkei</i> ^{*2}	Jun. 1985	D	0/2	< 5	—
"Akanishi", <i>Rapana thomasi</i> ^{*2}	Jun. 1985	D	0/1	< 4	—
"Himeitomakibora", <i>Pleuroploca trapezium audouini</i>	Jun. 1985	D	0/1	< 3	—
"Itayagai", <i>Pecten (Notovola) albicans</i> ^{*2}	Aug. 1984	G	0/3	< 3	—
	Apr. 1985	D	0/4	< 3	—
	May. 1985	C	0/9	< 3	—
"Hiratumegani", <i>Ovalipes punctatus</i> ^{*2}	Aug. 1984	G	0/3	< 3	—
	Aug. 1984	B	0/2	< 3	—
"Subesubemanjyugani", <i>Atergatis floridus</i>	Nov. 1984	F	3/4	< 10	190
"Trafukarappa", <i>Calappa lophos</i>	Jan. 1985	A	0/3	< 3	—
"Tunonagakobushi", <i>Leucosia longifrons</i> ^{*2}	Apr. 1985	D	0/5	< 3	—

^{*1} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

^{*2} Edible.

^{*3} Unknown: landed at Saiki fish market.

Table I -12. Toxicity of the trumpet shell "Boshubora" collected from several places in Oita Prefecture (digestive gland)

No.	Date	Place ^{*1}	Weight	Toxicity	
			g	MU/g	MU
1	Dec. 15. 1983	UK ^{*2}	50	6.8	340
2	Mar. 2. 1984	E	13	140	1,800
3	Mar. 5. 1984	E	11	9.7	110
4	Mar. 6. 1984	G	13	8.6	110
5	Mar. 6. 1984	D	18	4.7	85
6	Mar. 8. 1984	E	5	24	120
7	Mar. 8. 1984	F	20	5.5	110
8	Mar. 12. 1984	G	14	< 5	< 60
9	Mar. 12. 1984	G	13	16	210
10	Mar. 13. 1984	D	8	63	500
11	May. 8. 1984	F	15	4.9	74
12	May. 8. 1984	D	12	110	1,300
13	May. 10. 1984	D	31	49	1,500
14	May. 15. 1984	D	14	28	390
15	May. 15. 1984	D	17	72	1,200
16	May. 15. 1984	E	12	21	250
17	May. 18. 1984	D	14	5.9	83
18	May. 19. 1984	E	8	29	230
19	May. 19. 1984	E	24	17	410
20	May. 21. 1984	E	11	48	530
21	Jun. 20. 1984	D	8	43	340
22	Jun. 20. 1984	D	12	190	2,300
23	Jun. 20. 1984	D	27	230	6,200
24	Jun. 21. 1984	G	32	6.4	210
25	Jun. 21. 1984	G	29	8.1	240
26	Jun. 21. 1984	E	17	42	710
27	Jun. 22. 1984	E	25	21	530
28	Jun. 22. 1984	G	14	6.0	84
29	Jun. 25. 1984	D	13	46	600
30	Jun. 25. 1984	D	9	37	330
31	Aug. 10. 1984	G	16	< 5	< 80
32	Aug. 10. 1984	G	11	8.5	94
33	Aug. 10. 1984	G	33	6.6	220
34	Aug. 10. 1984	G	28	9.4	260
35	Aug. 10. 1984	G	19	9.4	180
36	Aug. 10. 1984	G	15	50	750
37	Aug. 10. 1984	G	10	16	160
38	Aug. 10. 1984	G	20	< 5	< 100
39	Aug. 10. 1984	G	36	43	1,500
40	Aug. 10. 1984	G	29	69	2,000
41	Sep. 5. 1984	D	13	< 5	< 65
42	Sep. 5. 1984	F	17	36	610
43	Nov. 16. 1984	F	73	750	55,000
44	Nov. 16. 1984	F	18	48	860
45	Jun. 20. 1985	D	22	43	950
46	Jun. 20. 1985	D	14	35	490
47	Jun. 20. 1985	G	20	130	2,600
48	Jun. 20. 1985	G	25	110	2,800
49	Jun. 21. 1985	D	11	6.1	67
50	Jun. 21. 1985	D	31	210	6,500
51	Jun. 24. 1985	D	16	14	220
52	Jun. 24. 1985	D	14	38	530
53	Jun. 24. 1985	F	17	9.9	170
54	Jun. 24. 1985	F	21	96	2,000
55	Jun. 24. 1985	F	44	12	530
56	Jun. 25. 1985	D	85	44	3,700

^{*1} D: Saiki; E: Mizunoko; F: Yonouzu; G: Kamae.

^{*2} Unknown: landed at Saiki fish market.

従って分類すると、強毒が 8 個体 (14.3%)、弱毒が 28 個体 (50.0%)、無毒が 20 個体 (35.7%) であった。これを過去に食中毒が発生した 3 地域のうち、静岡県清水市での調査結果 (NARITA, *et al.*, 1981) と比較すると全般的に毒性は低い、和歌山県美浜町の調査結果 (丸山ら, 1983) と同程度で、宮崎県 (境, 1985) より高い毒化状況を示した (Table I-13)。

Fig. I-13 では、採取海域 (D～G の 4 海域) 別に各個体の中腸腺毒力をプロットした。弱毒以上の有毒個体出現率と毒力平均値が佐伯湾～米水津村沖 (D～F 海域) で高く、蒲江町沖 (G 海域) で低い傾向がみられた。しかし、毒力の最高値は 4 海域とも強毒以上であった。これを津久見湾 (C 海域) 及び蒲江町沖 (G 海域) について調査した境 (1985) の結果から考察すると、佐伯湾～米水津村沖にかけての海域 (D～F 海域) で毒性が高く、その南北に位置する蒲江町沖 (G 海域) と津久見湾 (C 海域) で毒性が低かった。

Table I-13. Summary of toxicity of a trumpet shell "Boshubora" specimens collected at the Oita coast

Toxicity	Oita	Reference		
		Shizuoka	Wakayama	Miyazaki
Non-toxicity < 10 MU/g	20 ^{*1} (35.7%)	7 (14.6%)	24 (32.4%)	314 (80.9%)
Weak toxicity 10～< 100 MU/g	28 (50.0%)	18 (37.5%)	37 ^{*2} (50.0%)	74 ^{*3} (19.1%)
Strong toxicity 100～< 1,000 MU/g	8 (14.3%)	21 (43.7%)	13 (17.6%)	
Very strong toxicity ≥ 1,000 MU/g	0 (0%)	2 (4.2%)	0 (0%)	
Total	56 (100%)	48 (100%)	28 (100%)	388 (100%)
Maximum (MU/g)	750	1,950	480	106
(total MU)	55,000	—	37,000	—
Mean±S.D. (MU/g)	55±110	230±370	—	3.7
(total MU)	1,800±7,400	—	—	—

*1 Number of specimen.

*2 Toxicity of 5 MU/g or higher.

*3 Toxicity of 2 MU/g or higher.

貝の重量と毒力及び中腸腺の重さと毒力の間には、相関関係は認められなかった。また、中腸腺の毒力が 35 MU/g~130 MU/g の 4 個体について筋肉部分の毒性を調べたが、毒性は認められなかった。TTX によるヒトの最小致死量は 10,000 MU といわれている。今回の調査で、これを上回る個体が検出されたことから、摂食時には中腸腺を除去する必要があると考えられた。

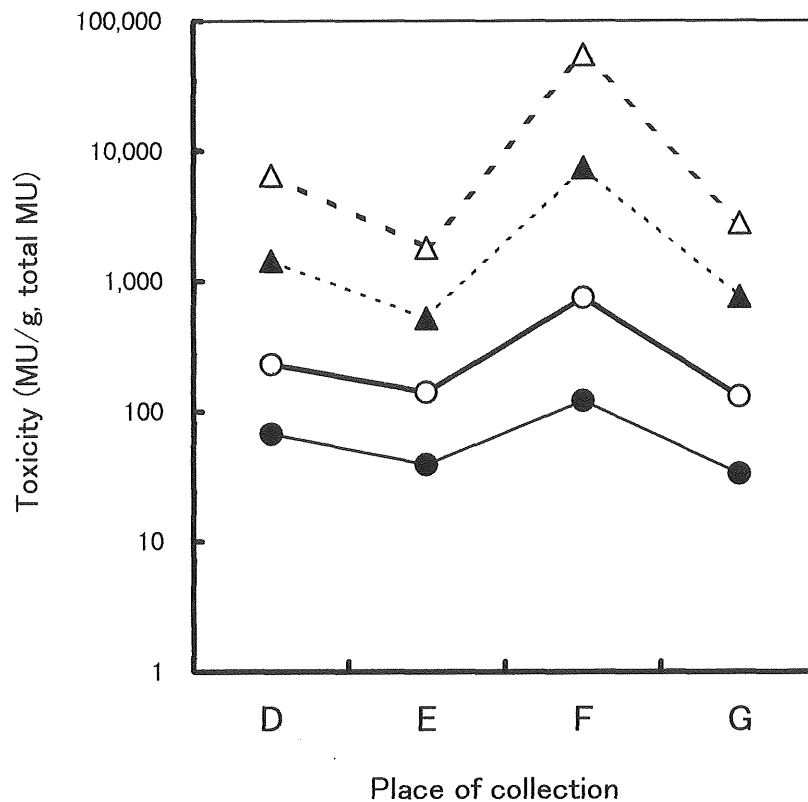


Fig. I -13. Local variation of toxicity of a trumpet shell "Boshubora" specimens collected at four places in Oita.

○—○, maximum (MU/g); ●—●, mean (MU/g);
 △···△, maximum (total MU); ▲···▲, mean (total MU).

2. テングニシの毒性

テングニシによる食中毒事例はないが、成田ら(1982)は中腸腺に麻痺性毒を認め、毒の本体を TTX としている。今回の調査では、23 個体中 6 個体(26.1%)の中腸腺から 2 MU/g 以上の毒性を検出した。毒力の最高値は 8.7 MU/g であり、毒性を検出した 6 個体の毒力平均値は 4.8 MU/g であった。また、毒量の最高値は 95.7 MU であり、毒性を検出した 6 個体の毒量平均値は 55 MU であった。これを成田ら(1982)の調査結果と比較すると、毒性検出率は成田らの 8% (25 個体中 2 個体 ; 検出下限 2 MU/g) に対して 26.1% と高かったが、毒力の最高値は 12 MU/g に対して 8.7 MU/g とほぼ同程度であった。貝の重量と毒力及び中腸腺重量と毒力の間には、相関関係はみられなかった。

テングニシは、大分県下の漁業関係者らがしばしば摂食する巻貝といわれている。今回の調査結果程度の毒性では食中毒を起こす可能性はほとんどないと思われるが、毒性の個体差の大きいことを考慮すれば、やはり中腸腺は除去してから摂食すべきと考えられた。

3. スベスベマンジュウガニの毒性

4 個体中 3 個体の付属肢から、TTX として 10 MU/g 以上の毒性を検出した。毒力の最高値は 190 MU/g であり、毒性を検出した 3 個体の毒力平均値は 107 MU/g であった。スベスベマンジュウガニは、大分県下では食習慣がないが、誤って摂食されることがないように注意する必要があると考えられた。

第 5 節 要 約

1. 筋肉摂食による死者 1 名を含む食中毒事例が過去にある大分県国東沿岸産ヒガンフグ及びコモnfグについて、部位別及び季節別の毒性を検討した。1983～96 年に漁獲されたヒガンフグ 46 個体とコモnfグ 34 個体中、筋肉の有毒率及び最高毒力はヒガンフグが 6.5% 及び 55 MU/g、コモnfグが 41.2% 及び 84 MU/g であった。食用不可とされる三陸沿岸産の両種より筋肉の毒性は低いものの、ヒガンフグは毒力の個体差が著しく、コモnfグは活魚でも有毒率が 19.0% と高いことから、食用に供するには検討を要する魚種と考えられた。また、両種とも皮膚、肝臓及び卵巣の毒力相互間に高い相関関係がみられた。

2. 未利用フグ種のホシフグについて、部位別及び季節別の毒性を検討した。1990～97 年に大分県豊後水道で漁獲された 79 個体(雄 39 個体、雌 40 個体)と 1990 年に山口県沖で漁獲された 1 個体(雌)の毒力レベルは、皮膚と腸管が弱毒、卵巣が強毒を示し、筋肉、肝臓、精巣は無毒であった。このうち、豊後水道産では皮膚の有毒率 11.4% で最高毒力 37 MU/g、卵巣の有毒率 80.0% で最高毒力 640 MU/g、腸管はすべて無毒を示した。豊後水道産同魚の季節別毒性は、皮膚では 8 月と 10 月に有毒個体が検出された。卵巣では 6 漁獲月(3, 5, 8～11 月)すべてに有毒個体が検出され、有毒率は 50～100% を示した。本種の卵巣は、初夏から秋に毒性の高いことが示唆された。豊後水道で漁獲されるホシフグは中型種とされる同魚としてはやや小ぶりであるが、筋肉は季節的変化もなく無毒であり、食用が可能と判断された。

3. 1983～85 年に大分県豊後水道で採取されたフグ以外の魚介類について毒性を調べた結果、ボウシュウボラ、テングニシ(以上、巻貝)及びスベスベマンジュウガニの 3 種から TTX を検出した。このうち、他県で食中毒事例

のあるボウシュボラ 56 個体の有毒率は 64.3%で、最高毒力 750 MU/g、最高毒量 55,000 MU を示した。TTX によるヒトの最小致死量を上回る個体が検出されたことから、食中毒の恐れのあることが判明した。また、採取した 4 海域で毒性に違いがみられた。ボウシュウボラ、テングニシなどこの地域で食習慣のある巻貝類については、中腸腺を除去して摂食する必要があると考えられた。

第2章 フグ肝臓の伝統的調理法における除毒

前章では、食中毒事例のあるフグ 2 種と毒性不明のフグ 1 種について毒性を明らかにし、またフグ毒化の背景ともなるフグ毒保有魚介類の毒性を調べた。これらは、いずれもフグ毒による食中毒の防止と資源の有効利用を目的とした検討であった。本章ではこの視点を更に進め、本来有毒部位であるフグの肝臓が加工処理することで利用できないかを検討した。研究の対象としたフグ肝臓の加工処理方法は、大分県下のフグ料理専門店で古くから伝わるいくつかの調理法の中で代表的なものである。

第1節では、大分県のフグ料理専門店及びフグ卸店に入荷した西日本近海産のトラフグとカラスの肝臓毒性を調べ、大分地方に伝わるフグ肝臓の調理法に用られてきたとされるこれら両種フグの有毒率と最高毒力、最高総毒量等の実態把握を行った。

第2節では、上記の調査で得られたフグの有毒肝臓を用いて、実際にフグ料理専門店の伝統的肝臓調理法で処理したとき、果たして除毒効果が認められるかを検討した。

第3節では、第2節で除毒効果が認められた伝統的フグ肝臓調理法の除毒機構について、その解明を行った。

第1節 フグ専門店入荷フグ2種の肝臓毒性

大分県のフグ料理専門店等では、フグの肝臓を独特の調理方法で処理したものが「キモ料理」として提供されてきた。しかし、フグの食中毒事故防止を目的とした1983年12月の厚生省通知(厚生省, 1983)により、その種類にかかわらずフグの肝臓は食用に供することができなくなった。厚生省通知のフグ可食リストの例外として、有毒部位を用いた製品にもかかわらず食用が認められているものには、石川県産「フグ卵巣の糠漬」と山口県産「ゴマフグの皮」がある(田口, 1984; 小沢, 1983a, 1983b, 1986)。これらの製品はいずれも塩蔵品で、通常少量しか摂食しないこと、製品をロット管理して安全性を確認しているなどの理由により、食用が許可されている。有毒部位であるフグの肝臓を上記の卵巣や皮のように無毒化して利用できるならば、資源の有効活用になる。

本節では、大分県のフグ料理専門店及びフグ卸店に入荷した西日本近海産のトラフグとカラスの肝臓毒性を調べ、「キモ料理」に用いられてきたとされる両種フグの有毒率、最高毒力、最高総毒量等の実態把握を行った。

試料及び方法

1984年3月から1985年5月にかけて、大分県別府市及び臼杵市内のフグ料理専門店並びにフグ卸店に入荷したトラフグ *Takifugu rubripes* 242 個体(雄 71 個体, 雌 171 個体)とカラス *Takifugu chinensis* 50 個体(雄 19 個体, 雌 31 個体)の肝臓を試料とした。これらは、山口県下関市(トラフグ 202 個体, カラス 50 個体)、鹿児島県志布志町(トラフグ 19 個体)、岡山県倉敷市(トラフグ 10 個体)及び大分県沖の豊後水道(トラフグ 12 個体)で水揚げまたは漁獲された、いずれも天然ものである。毒性試験は、「食品衛生検査指針Ⅱ」中のフグ毒検査法(厚生省, 1978)に従って行った。毒力は谷(1945)の方法に

従って評価し、無毒は 10 MU/g 未満、有毒は 10 MU/g 以上で、有毒のうち 10～100 MU/g 未満は弱毒、100～1,000 MU/g 未満は強毒、1,000 MU/g 以上は猛毒とした。

結果及び考察

毒性の調査結果を Table II-1 及び Fig. II-1 に示した。Table II-1 には、谷(1945)及び加納ら(1984)の九州産トラフグとカラスのデータを参考のため併記した。

1. トラフグの肝臓毒性

1. 1 雌雄別の毒性

雄 71 個体中、10 MU/g 以上の毒性を示したのは 5 個体(以下、5/71 と略記する)で、有毒個体の出現率は 7.0%であった。その最高毒力は、113 MU/g、最高総毒量は 76,900 MU であった。一方、雌では 10 MU/g 以上の毒性を示したのは 22.2% (38/117) で、最高毒力 1,270 MU/g、最高総毒量 571,000 MU であった。すなわち、雌は雄より強毒で性差を示していた。Fig. II-1 には、10 MU/g 以上の個体の毒性を性差で示した。

以上の結果を古く北九州産トラフグを調査した谷(1945)及び九州周辺海域産トラフグを調査した加納ら(1984c)の報告と比較すると、有毒個体出現率は雌雄ともに加納らの調査結果に極めて類似していた。また、今回の調査での最高毒力は 1,270 MU/g(雌)であったが、これに次ぐ毒力は 501 MU/g(雌)であり、谷(1945)や加納ら(1984c)の報告にみられる最高毒力とほぼ一致していた。このことはトラフグの場合、肝臓毒力が 1,000 MU/g を超える個体は極めて稀であることを示唆している。

1. 2 肝臓重量との関係

Fig. II-2 には 10 MU/g 以上の有毒個体について、肝臓の重量と毒力との関係をプロットした。肝臓重量と毒力との間に特に相関関係は認められないが、

Table II — 1. Toxicity of "Torafugu" and "Karasu" livers collected at "Fugu" restaurants

	"Torafugu"						"Karasu"			
	From "Fugu" restaurants		Data by TANI		Data by KANOH <i>et al.</i>		From "Fugu" restaurants		Data by KANOH <i>et al.</i>	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Frequency of toxic ^{*1} specimens (%)	7.0 (5/71) ^{*2}	22.2 (38/171)	11.8 (2/17)	38.2 (52/136)	9.5 (2/21)	21.7 (5/23)	15.8 (3/19)	9.7 (3/31)	15.0 (6/40)	23.1 (6/26)
Highest toxicity (MU/g)	113	1,270	100	500	100	510	66.0	130	100	1,500
Highest total toxicity (MU/g)	76,900	571,000	5,000	100,000	—	—	8,600	14,200	—	—

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

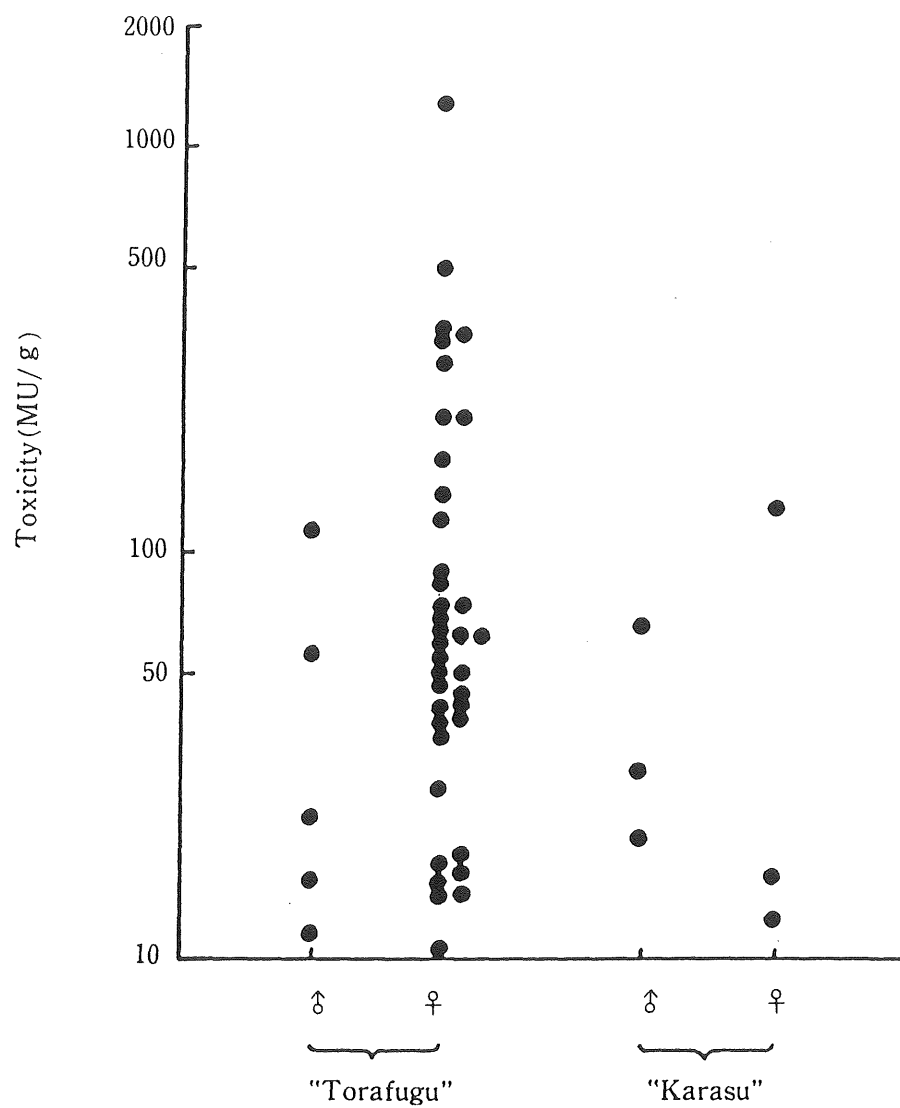


Fig. II —1. Toxicity of "Torafugu" and "Karasu" liver specimens tested.

Each spot shows the toxicity above 10 MU/g.

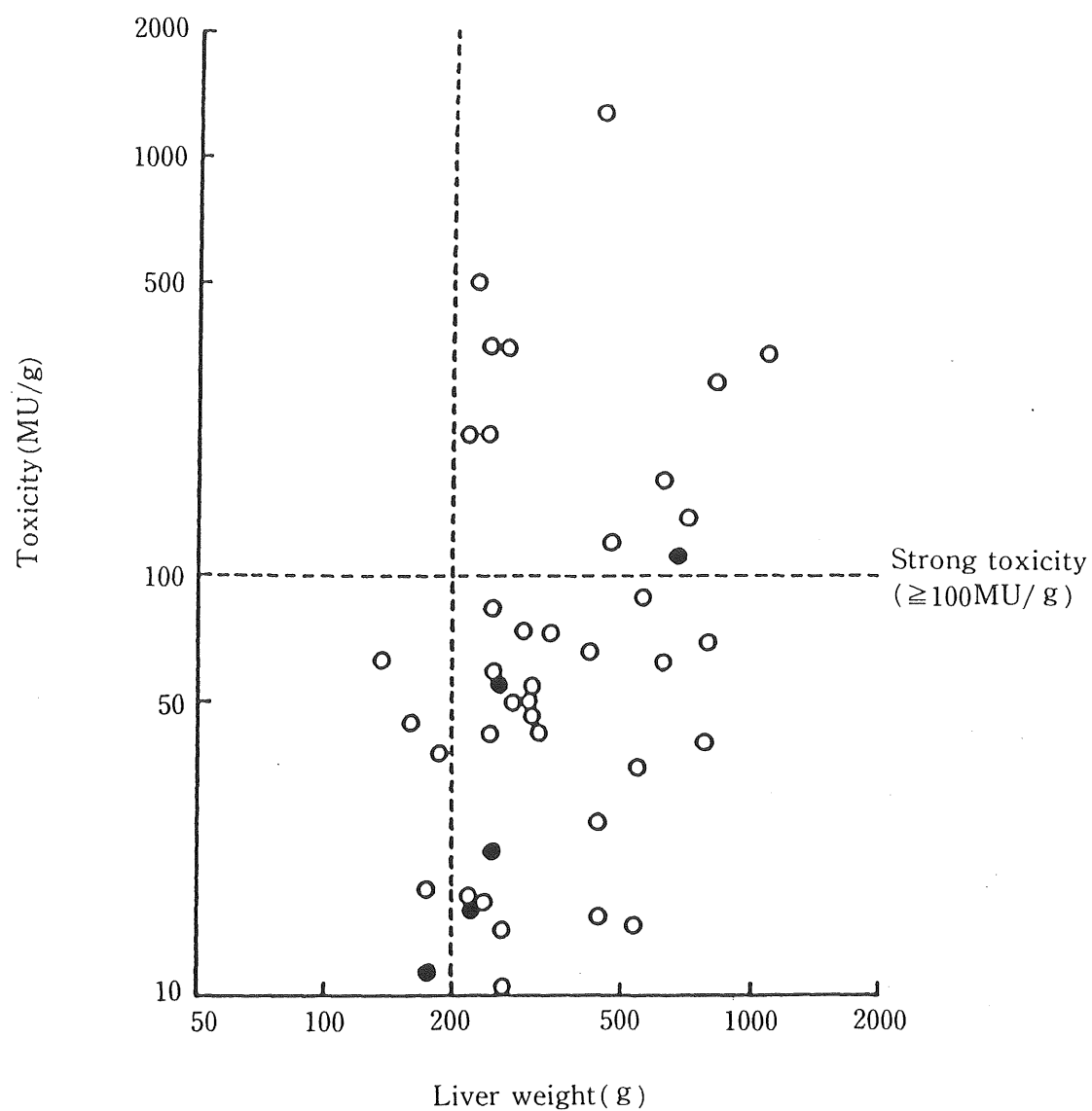


Fig. II —2. Correlation between liver weight and toxicity in a puffer fish “Torafugu” specimens tested.

Each spot shows the toxicity above 10 MU/g of male (●) and female (○) specimens tested.

Table II — 2. Correlation between weight and toxicity of "Torafugu" liver specimens tested

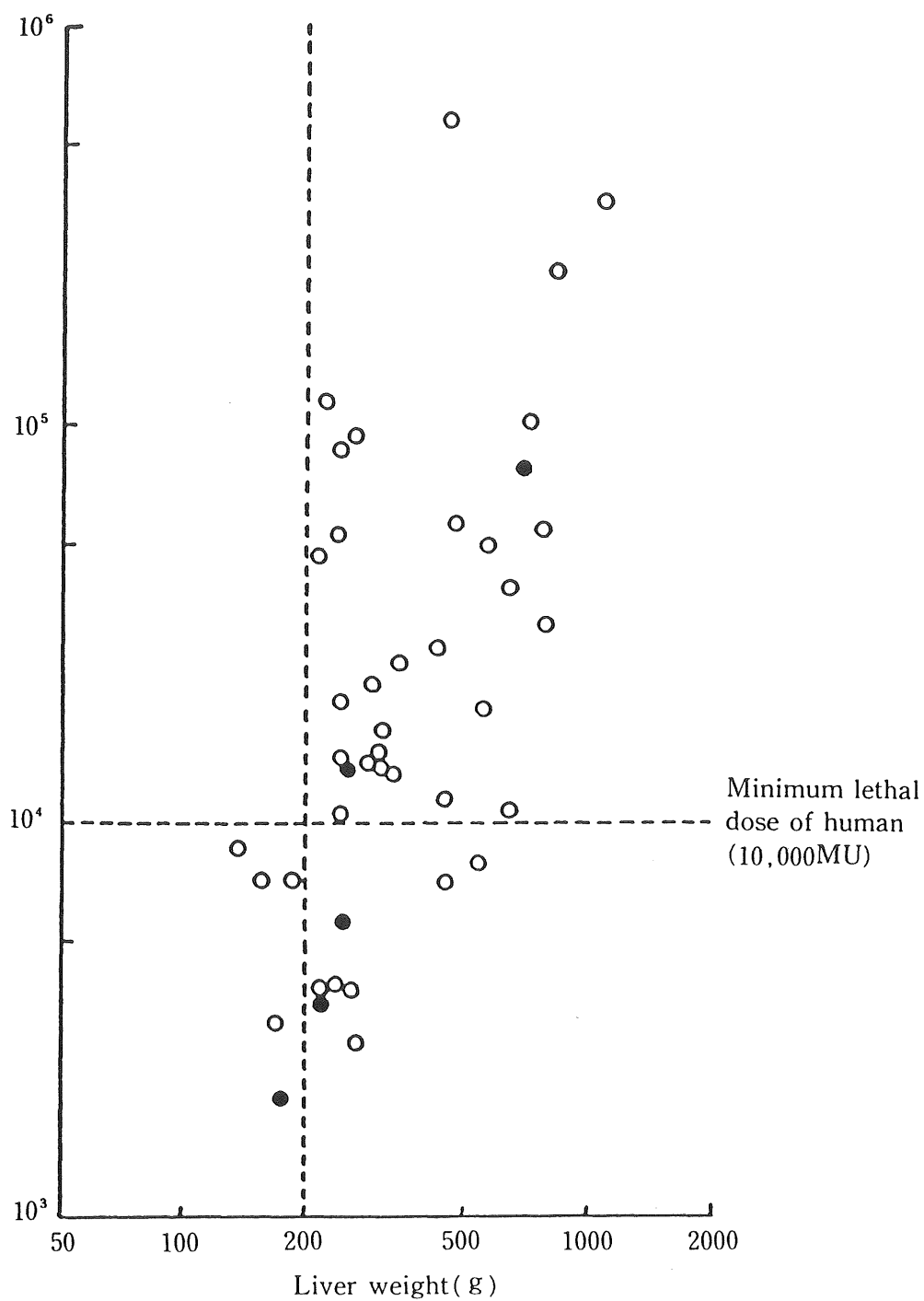
		Liver weight (g)					
		< 200 ^{*2}			≥ 200 ^{*3}		
		Male	Female	Total	Male	Female	Total
Frequency of toxic ^{*1} specimens (%)	≥ 10 MU/g	2.1 (1/48) ^{*4}	5.3 (4/76)	4.0 (5/124)	17.4 (4/23)	35.8 (34/95)	32.2 (38/118)
	≥ 100 MU/g	0 (0/48)	0 (0/76)	0 (0/124)	4.3 (1/23)	11.6 (11/95)	10.2 (12/118)
Highest toxicity (MU/g)		11.5	62.3	62.3	113	1,270	1,270
Highest total toxicity (MU/g)		2,000	8,600	8,600	76,900	571,000	571,000

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Minimal liver weight was 25 g.

^{*3} Maximal liver weight was 1,630 g.

^{*4} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.



100 MU/g 以上の有毒個体は 12 個体全部が肝臓重量 200 g 以上であった。

そこで、肝臓重量 200 g を境界として毒性との関係を調べ、Table II-2 に示す結果を得た。10 MU/g 以上の有毒個体出現率は、肝臓重量が 200 g 未満では 4.0% (5/124) であるのに対して肝臓重量 200 g 以上では 32.2% (38/118) であった。また最高毒力は、肝臓重量 200 g 未満では 62.3 MU/g に対して 200 g 以上では 1,270 MU/g、最高総毒量はそれぞれ 8,600 MU に対して 571,000 MU であった。いずれも、肝臓重量 200 g 以上の方が 200 g 未満より圧倒的に毒性は強力である。この傾向は、雌雄を別にしても全く同様であった。

更に、肝臓重量と肝臓総毒量との関係を調べたところ、Fig. II-3 に示したようにフグ中毒時のヒトの最小致死量といわれる 10,000 MU を超える個体は、30 例全部が肝臓重量 200 g 以上であった。これに関して、加納ら(1984c)は魚体重約 300 g (肝臓重量にして、約 10~30 g) の瀬戸内海産当才魚 173 個体の肝臓毒性を調査し、10 MU/g 以上の有毒個体はわずか 1 個体 (170 MU/g) にすぎなかったと報告している。

1. 3 季節変化との関係

谷(1945)は、トラフグの肝臓毒性に季節的变化が認められることを報告している。Table II-3 では 12 月~4 月のいわゆる抱卵期に捕獲された個体について上述した肝臓重量と毒性との関係をみたところ、10 MU/g 以上の有毒個体出現率は肝臓重量 200 g 未満が 6.6% (5/76) に対して肝臓重量 200 g 以上が 22.0% (13/59)、最高毒力はそれぞれ 62.3 MU/g に対して 501 MU/g、また最高総毒量はそれぞれ 8,600 MU に対して 113,000 MU であった。この傾向は雌雄別でも同様であった。このように肝臓毒性が強まる季節といわれる抱卵期においても、肝臓重量と毒性との上述の関係を再度確認できた。

以上の結果から、肝臓重量の大きいものの方が小さいものより毒性が強いことが示唆された。大分地方の「キモ料理」で使用されるトラフグは、通常 1kg 程度の小ぶりのものが多いといわれている。上記の肝臓重量と毒性との関係が推察されて興味深い。他方、加納ら(1984c)の瀬戸内海産当才魚で有

Table II — 3. Correlation between weight and toxicity of "Torafugu" liver specimens collected before the breeding season, from December 1984 to April 1985

		Liver weight (g)					
		< 200 ^{*2}			≥ 200 ^{*3}		
		Male	Female	Total	Male	Female	Total
Frequency of toxic ^{*1} specimens	≥ 10 MU/g	3.1 (1/32) ^{*4}	9.1 (4/44)	6.6 (5/76)	10.5 (2/19)	27.5 (11/40)	22.0 (13/59)
(%)	≥ 100 MU/g	0 (0/32)	0 (0/44)	0 (0/76)	5.3 (1/19)	17.5 (7/40)	13.6 (8/59)
Highest toxicity (MU/g)		11.5	62.3	62.3	55.5	501	501
Highest total toxicity (MU/g)		2,000	8,600	8,600	14,100	113,000	113,000

^{*1} The term of "toxic" represents the toxicity score of 10 MU/g or higher.

^{*2} Minimal liver weight was 25 g.

^{*3} Maximal liver weight was 1,630 g.

^{*4} Number of toxic specimens per total number of specimens tested.

毒であった唯一の個体が 170 MU/g の強い毒力を示したことは、肝臓の小さなものでも喫食すれば食中毒を起こしうるわけで、食品衛生上からは十分留意する必要があると思われる。

2. カラスの肝臓毒性

雄では 10 MU/g 以上の有毒個体出現率 15.8% (3/19)、最高毒力 66.0 MU/g、最高総毒量 8,600 MU に対して、雌ではそれぞれ 9.7% (3/31)、130 MU/g、14,200 MU であった。最高毒力及び最高総毒量はトラフグと同様の性差傾向を示したが、有毒個体出現率はトラフグの場合とは逆に雄の方が高かった (Table II-1, Fig. II-1)。

下関に水揚げされたカラス 66 個体の毒性を調査した加納ら (1984c) によると、10 MU/g 以上の有毒個体出現率及び最高毒力は共に雄より雌の方が高く、かつ性差が認められるという (Table II-1)。一方、遠藤 (1984) はフグの毒性の性差について、生殖巣以外の部位では雄に比して雌の方が強い毒性を示す傾向を認めるものの魚種によって必ずしも普遍的ではなく、個体差が極めて大きいことを報告している。今回の検討では、加納らの報告にみるような明らかな毒性の性差はカラスでは確認できなかった。

以上の検討で検出したカラスの最高毒力は、雌の 130 MU/g であった。加納ら (1984c) は、カラスの最高毒力を雌の 1,500 MU/g と報告している (Table II-2)。トラフグ同様に、肝臓の最高毒力が 1,000 MU/g を超える個体はカラスでも稀であることが推察された。

第2節 伝統的調理法及びその除毒効果

前節では、フグ料理専門店やフグ卸店に入荷したトラフグとカラスの肝臓毒性を調べた。本節では、この際に入手した両種の有毒肝臓を用いて、フグ料理専門店の専門調理師が伝統的調理法に従って調理した「キモ料理」について、除毒の効果を検討した。調理方法は、大分地方のフグ料理専門店で古くから伝わる調理法の中で、代表的なものの一つである。

試料及び方法

1. 試料

1984年3月から1985年5月にかけて、大分県のフグ料理専門店等から入手したトラフグ *Takifugu rubripes* の肝臓19検体及びカラス *Takifugu chinensis* の肝臓2検体を用いて、調理による除毒試験に供した。

2. 調理による除毒試験

個々の有毒肝臓はすべて、Fig. II-4に示した調理法に従い、専門のフグ調理師によって処理された。この際、手揉み・水晒しなど、各調理工程ごとの処理時間や肝臓重量の変化を調べると共に、一部を抜き取って毒性試験用の試料とした。

3. 毒性試験法

毒性試験は、「食品衛生検査指針Ⅱ」のフグ毒検査法(厚生省, 1978)に準じて行った。

結果及び考察

1. 調理方法

検討したフグ肝臓調理法は、大分県のフグ料理専門店で行われていたもの

の中で代表的なものと考えられる方法である。具体的には、Fig. II-4 に示すような調理工程から成っている。

まず、肝臓の端の部分切除した後、皮を剥ぎ、1 片を 10～15 g 程度に細切したものを流水下で手揉みする。これを調理鍋に入れ、流水下で水晒した後、煮沸を繰り返す方法で、全工程を処理するのに約 4 時間を要した。このうち、手揉み・水晒しに要する時間は 10 分程度であり、ほとんどの時間が加熱処理に費されていることがわかった。

2. 調理による除毒効果

実施した調理法による除毒効果の判定結果を Table II-4 に示した。試料 21 検体には、調理前の毒力が、最低 62 MU/g、最高 1,270 MU/g のものまで含まれている。これらの調理後の毒力は、すべて 5 MU/g 未満で、厚生省の示す無毒基準(10 MU/g 未満)を満足する結果であった。

3. 調理工程ごとの毒力及び重量変化

調理工程ごとに肝臓毒力及び肝臓重量の変化について調べ、その代表例を Table II-5 に示した。本表から、肝臓毒力は各例とも工程ごとに減少し、調理前の毒力の多寡にもよるものの、4 回目あるいは 5 回目の煮沸工程後に 5 MU/g 未満まで減毒していることがわかる。

工程別に除毒効果を比較してみると、手揉み工程及び 1 回目の煮沸工程(IV)における除毒効果が特に著しく、この段階で約 80～90%の毒量が除去されることがわかった。

また、最終工程後の肝臓重量は、調理前の約 20～40%程度に減少しているが、手揉み工程及び 1 回目の煮沸工程における重量減少が大部分であった。

4. 調理時間と毒力変化の関係

検討結果の代表例を Fig. II-5 に示した。図中の肝臓毒力は重量補正值である。これは、調理中の重量減少による見かけ上の毒力上昇を、重量比で補

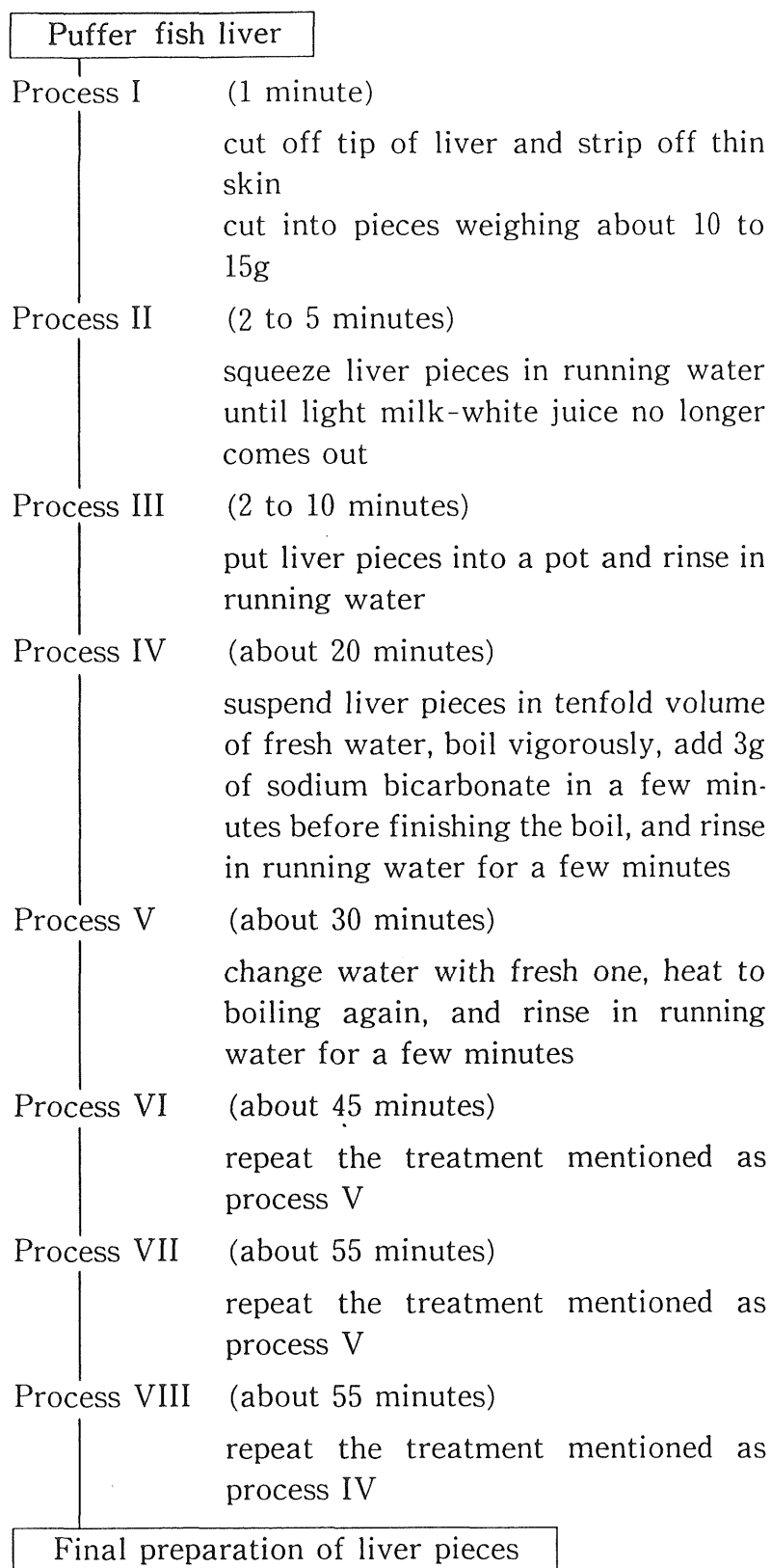


Fig. II -4. Cooking process of puffer fish liver.

Table II —4. Removal treatment of toxin from puffer fish liver done by professionally specified "Fugu" cookery

Number of sample	Species of puffer fish	Weight of liver (g)	Toxicity (MU/g)	
			Before treatment	After treatment
1	Torafugu (♀)	138	62	< 5
2	Torafugu (♀)	630	170	< 5
3 *	Torafugu (♀)	827	281	< 5
4 *	Torafugu (♀)	827	295	< 5
5	Torafugu (♀)	721	138	< 5
6	Torafugu (♂)	681	113	< 5
7	Torafugu (♀)	449	1,270	< 5
8	Torafugu (♀)	226	501	< 5
9	Torafugu (♀)	216	217	< 5
10	Torafugu (♀)	242	218	< 5
11	Torafugu (♀)	245	83	< 5
12	Torafugu (♀)	245	349	< 5
13	Torafugu (♀)	266	350	< 5
14 ◎	Torafugu (♀)	1,086	332	< 5
15 ◎	Torafugu (♀)	1,086	299	< 5
16	Torafugu (♀)	469	120	< 5
17	Torafugu (♀)	344	73	< 5
18	Torafugu (♀)	564	112	< 5
19	Karasu (♂)	130	66	< 5
20	Karasu (♀)	109	130	< 5
21	Karasu (?)	94	161	< 5

Each sample with a asterisk or a double circle is a half piece of a puffer fish liver, respectively.

Table II —5. Removal of toxin from puffer fish liver in each cooking procedure

Sample		Cooking process							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	Toxicity (MU/g)	170	99.1	112	56.8	28.5	7.7	< 5	< 5
	Weight ratio (%)	100	75.3	72.6	22.9	22.6	22.3	21.9	20.6
	Correction value of Toxicity (MU/g)	170	74.6	81.3	13.0	6.4	1.7	< 1.1	< 1.0
2	Toxicity (MU/g)	281	124	100	126	71.3	17.6	5.4	< 5
	Weight ratio (%)	100	86.9	86.0	25.1	24.8	24.5	24.2	21.8
	Correction value of Toxicity (MU/g)	281	108	86.0	31.6	17.7	4.3	1.3	< 1.1
3	Toxicity (MU/g)	138	122	95.9	67.1	38.8	12.3	5.4	< 5
	Weight ratio (%)	100	84.6	84.8	36.4	35.9	34.8	31.8	31.0
	Correction value of Toxicity (MU/g)	138	103	81.3	24.4	13.9	4.3	1.8	< 1.6
4	Toxicity (MU/g)	113	72.2	46.4	41.1	23.0	5.5	< 5	< 5
	Weight ratio (%)	100	84.7	85.9	44.3	42.4	42.2	41.6	42.1
	Correction value of Toxicity (MU/g)	113	61.2	39.9	18.2	9.8	2.3	< 2.1	< 2.1
5	Toxicity (MU/g)	1,270	760	748	375	128	27.7	11.2	< 5
	Weight ratio (%)	100	73.8	75.4	31.7	29.6	29.2	29.4	29.3
	Correction value of Toxicity (MU/g)	1,270	560	564	119	37.9	8.1	3.3	< 1.5

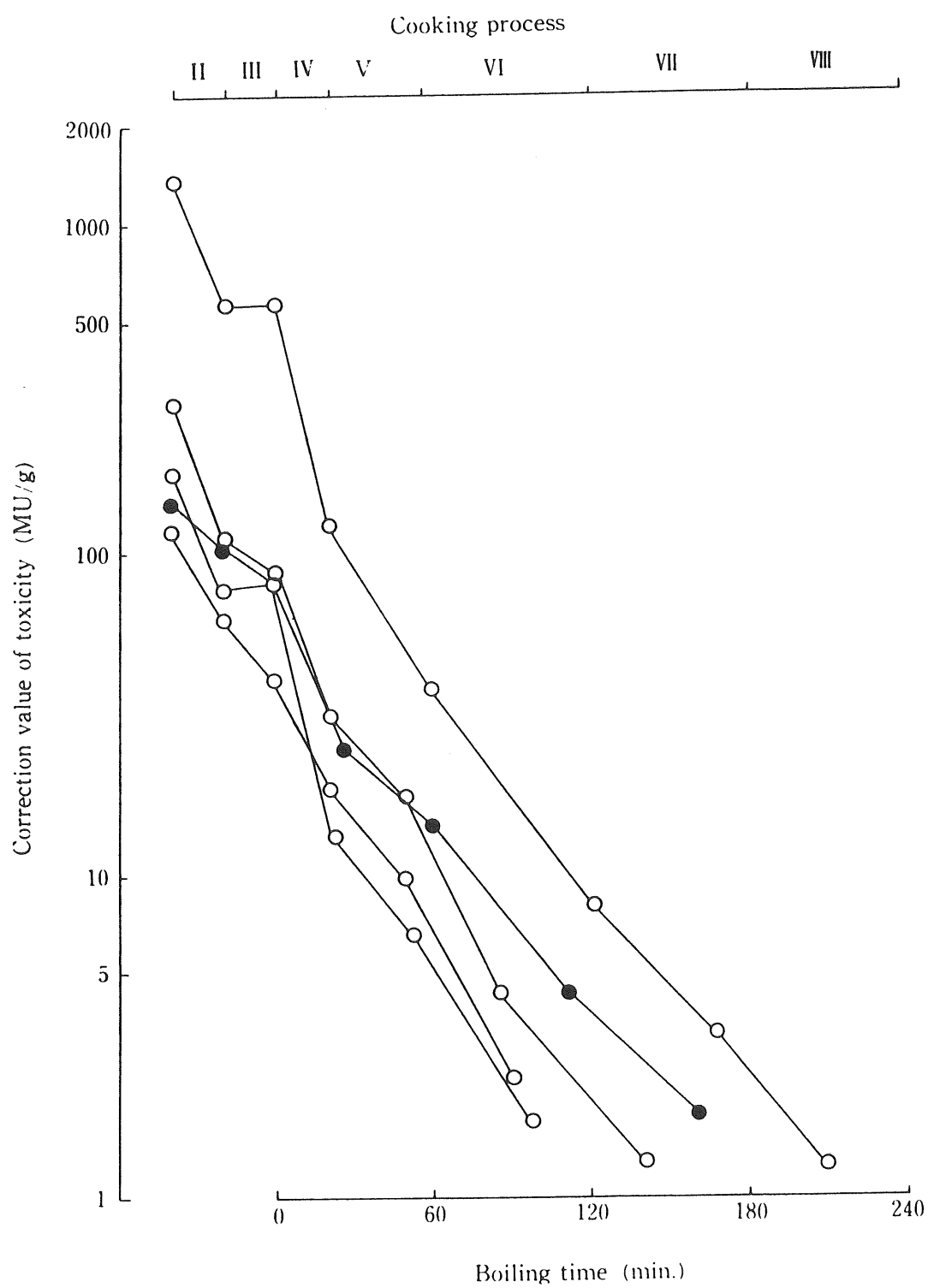


Fig. II—5. Detoxification profiles of toxin of puffer fish liver by cooking.

正したものである。各例とも毒力の減少の傾向は、煮沸時間の増加に伴って、毒力が指数的に減少してゆく傾向を示した。

5. 調理除毒法の有効性

検討の結果、調理試験を実施した有毒フグ肝臓のすべてが、基準の 10 MU/g 未満の無毒となったが、毒力の減少傾向を考慮するかぎり、著しい高毒力の肝臓ではそれだけ、水晒し、煮沸の繰り返しによる長時間の処理が必要となることが予想される。従って、現行の処理時間で無毒化できる毒力には上限があり、これを上回る有毒肝臓では除毒が不十分になることが推察される。

フグの毒性については、個体差や季節変動の著しいことが知られている(谷, 1945)ので、極めて毒力の高い個体の出現も否定できない。このことは、大分地方の肝臓調理の対象となっているトラフグ及びカラスにも適用される。従って、「キモ料理」の安全かつ確実な提供には、さらに除毒法に関する広域調査と開発が必要と考えられる。

第3節 伝統的調理法の除毒機構

前節では、大分地方に伝えられていたフグ肝臓の独特な調理方法について検討した結果、顕著な減毒効果を認めた。また、調理によるフグ肝臓の除毒効果に関しては、川崎ら(1978)の報告がある。それによると、広島県で行われていたトラフグ肝臓の調理方法は、細切した肝臓を流水下で手揉みし、血抜きしたものを煮沸する方法が一般的であるが、実際に除毒効果を調査したところ、除毒の不十分なものがあつたとされている。また、減毒機構については、溶出除去を主としたものであることを推定している。本節では、この点も含め、大分地方に伝わるフグの肝臓調理法の減毒機構について検討した。

試料及び方法

1. 試薬

- 1) TTX：トラフグの肝臓から GOTO ら(1965)の方法に準じて抽出、部分精製した TTX を用いた。そのほか、シグマ社製 TTX を標品として用いた。
- 2) アンヒドロテトロドトキシシン(anh-TTX)：マフグの肝臓から NARITA ら(1981)の方法に準じて精製した。
- 3) テトロドン酸(TDA)：津田(1967)に従って、TTX の水溶液を 100℃で 8 時間以上加熱して生成させたものを用いた。

2. 試験法

- 1) マウス試験法：「食品衛生検査指針Ⅱ」中のフグ毒検査法(厚生省, 1978)に従って行った。
- 2) HPLC 分析：TTX の加熱実験の試料は、NAGASHIMA ら(1987)の方法に従った。また、有毒肝臓の調理工程ごとの試料は、著者ら(第4章)の方法で分析した。

3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) : 試料を Whatman 社製 LHP-K プレートにスポットし、ピリジン : 酢酸エチル : 酢酸 : 水 (15:5:3:4) で展開した。風乾後、10% KOH を噴霧し、110℃で 10 分間加熱した。検出には紫外線ランプ (365 nm) を用い、テトロドトキシン類の標品と比較して同定した。また、必要に応じて Weber 試薬も併用した。

3) 電気泳動 : 試料を Chemetron 社製セルロースアセテート膜にスポットし、0.08M Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.7) 中で 0.8 mA/cm 幅の定電流下で 30 分間泳動した。TLC の場合と同様にして同定した。

3. TTX の加熱実験

TTX を蒸留水に溶かして毒力 96 MU/ml の水溶液 (pH 7) を調製した。この水溶液を 100℃で加熱し、一定時間毎にサンプリングしてマウス試験に供した。また、各加熱後の試料を同量ずつ分取して凍結乾燥した後、蒸留水に溶解し、HPLC、TLC 及び電気泳動に供した。さらに加熱 60 分後の試料をオートクレーブ中 125℃で処理した。この試料を上記と同様にしてマウス試験、HPLC、TLC、電気泳動に供した。

4. 肝臓の調理中における減毒実験

前節の調理方法に従って、専門のフグ調理師が処理した有毒トラフグの肝臓を試料に用いた。各調理工程ごとの試料から、0.1% 酢酸抽出法 (厚生省, 1978) で抽出した試験溶液をマウス試験及び HPLC 分析に供した。

結果及び考察

1. TTX の加熱変化

津田 (1967) は、TTX を長時間加熱すると無毒な TDA が生成することを報告している。このことから、肝臓調理方法の煮沸工程での減毒は、TTX から TDA への変化によるものと推定されたが、この点を明確にするため、部分精製した TTX 水溶液 (毒力 96 MU/ml, pH 7) を 100℃で加熱する実験を行った。

Fig. II-6 及び Fig. II-7 に種々の時間加熱後の HPLC クロマトグラムと

マウス毒性試験値を示す。加熱と共に毒力は減少し続け、このときクロマトグラム上では TTX→anh-TTX→TDA の変化が認められた (Fig. II-6)。減毒の傾向は、加熱後 20 分までが特に著しく 56% の減毒率を示したのに対し、加熱 60 分以降では 60 分毎の減毒率は 30~40% とほとんど一定率で減毒した (Fig. II-6)。anh-TTX の比毒性は、TTX の 1/500 といわれている (津田, 1967)。このことから、加熱後 20 分までの急激な減毒は、TTX→anh-TTX 変換に基づくと考えられる。また、加熱 240 分以後では、それまで認められていた Fig. II-6 中の “unknown” のピークが消失した。

Fig. II-8 には加熱 360 分後の HPLC クロマトグラムを示す。Fig. II-6 の場合の 7 倍量の試料を HPLC に注入して得られたものである。クロマトグラムは TDA の生成を顕著に示すと同時に 6 時間の加熱後でも、なお微量の TTX 及び anh-TTX が残存することを示している。このことは肝臓の伝統的な調理においても、高毒力の肝臓の場合、除毒が不十分なものとなる可能性があることを示している。

一方、加熱 60 分後の試料を分取して、Fig. II-7 のように 125℃ でオートクレーブ処理を行ったところ、毒力は 1 MU/ml 未満となった。これを 100℃ 120 分加熱後の試料の毒力 15 MU/ml と比較するとき、オートクレーブ処理による減毒効果は明らかに顕著であった (Fig. II-7)。この試料を HPLC に注入したところ、成績は示していないが TTX 及び anh-TTX は全く検出されず、TDA のピークのみを認めた。この結果から、加熱による無毒化は TDA の生成に基づくと考えられた。各加熱時間後の試料を TLC 及び電気泳動に供したところ、Rf 値及び電気泳動挙動から、加熱 20 分後には anh-TTX の生成を、また 120 分後には TDA の生成を確認した (Fig. II-9, Fig. II-10)。TDA への変換は高温ほど速いことが推察された。従って、肝臓調理においても圧力鍋で処理すれば、さらに減毒効果を高められることが示唆された。

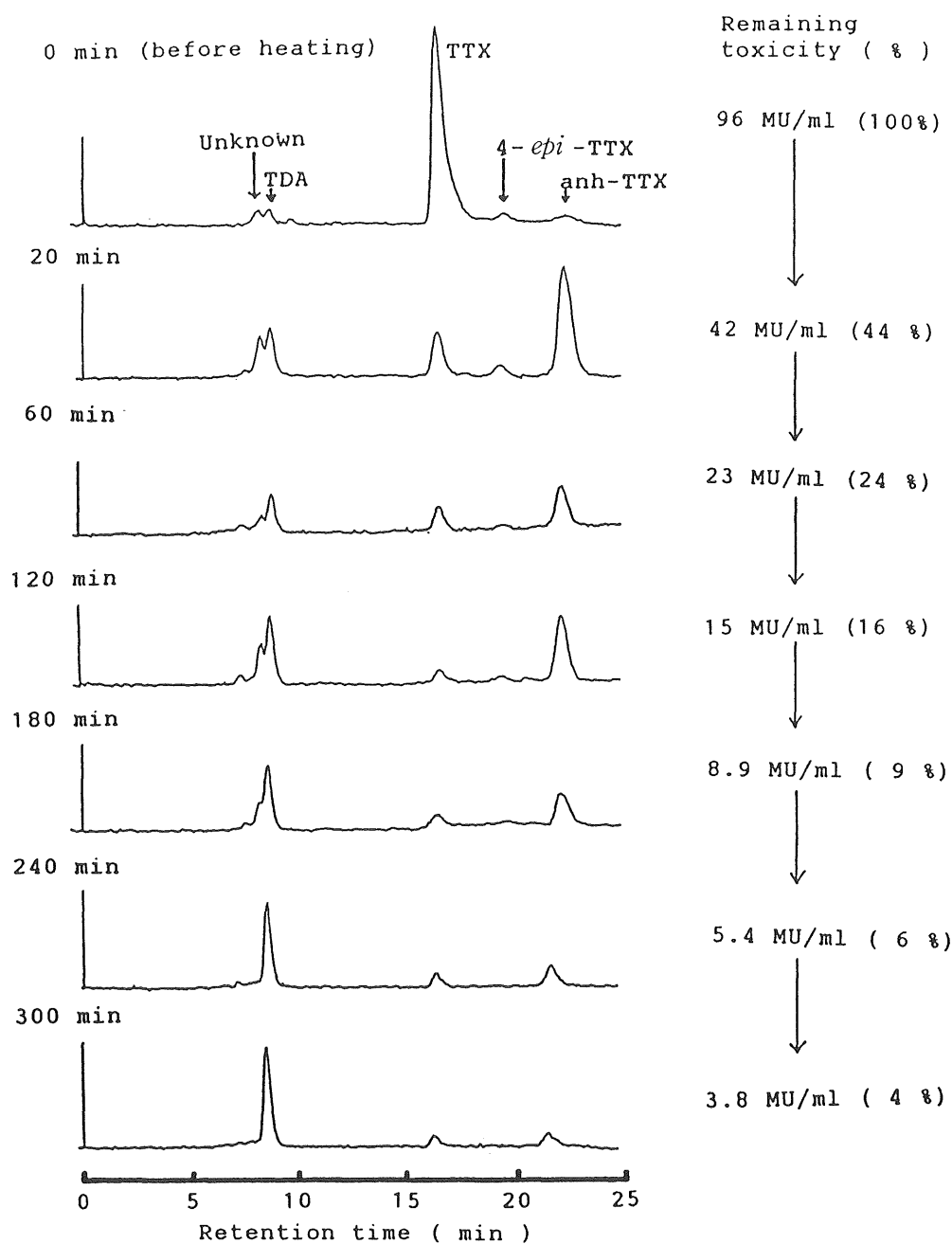


Fig. II—6. HPLC and mouse assay profiles of a TTX solution decomposed during heating at 100°C.

TTX was dissolved in distilled water. After heating for an indicated periods, the solution was examined for TTX composition by Nagashima's method and for the remaining toxicity by the mouse assay method.

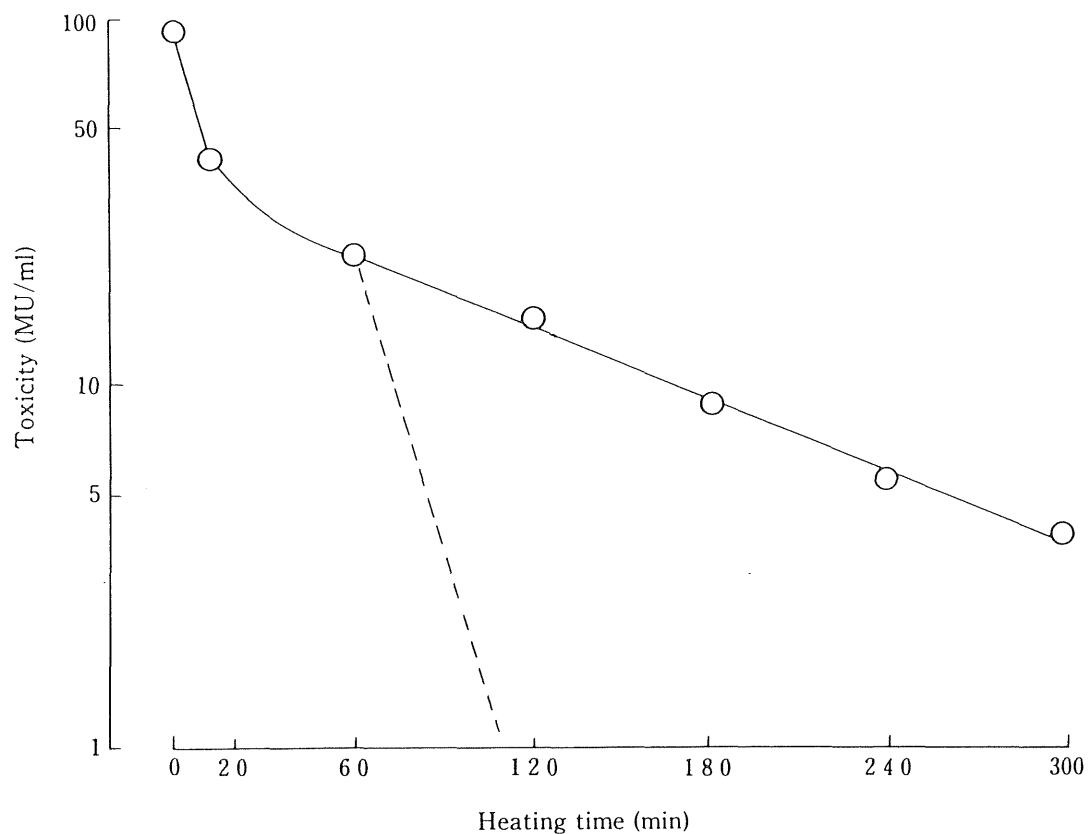


Fig. II—7. Decomposition profiles of a TTX solution on heating at 100°C (O—O) throughout, or on autoclaving at 125°C after a 60 min-heating at 100°C (---).

Toxicity was examined by the mouse assay method.

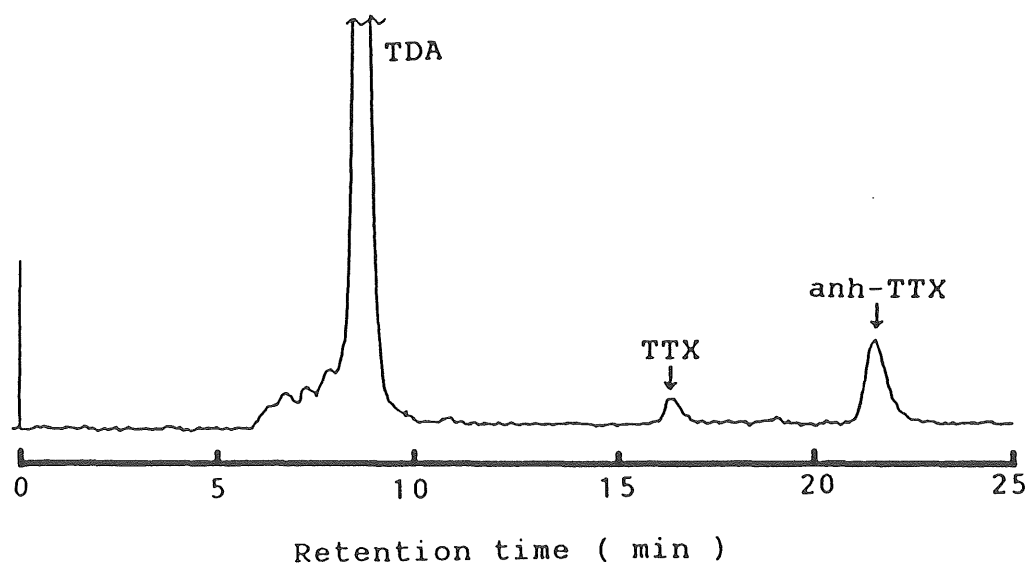


Fig. II—8. High performance liquid chromatogram of a TTX solution which was heated for 360 minutes at 100°C.

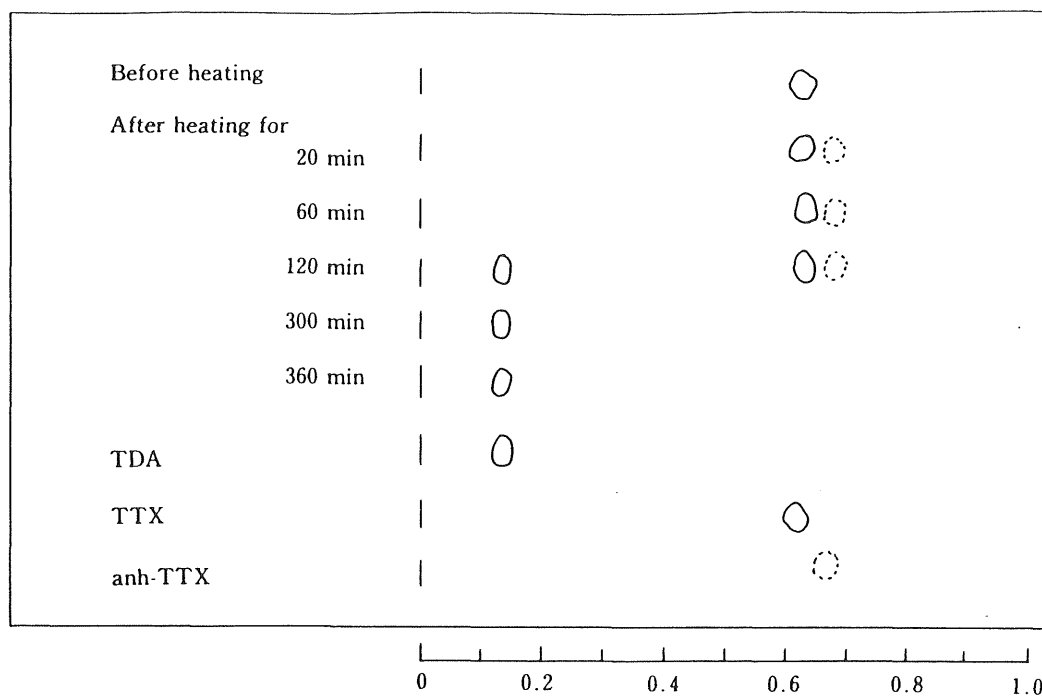


Fig. II —9. TLC of TTX solutions which were heated at 100°C for indicated periods, along with authentic TTX and related substances.

Whatman LHP-K plate was used.

Solvent: pyridine- ethylacetate- acetic acid- water (15:5:3:4).

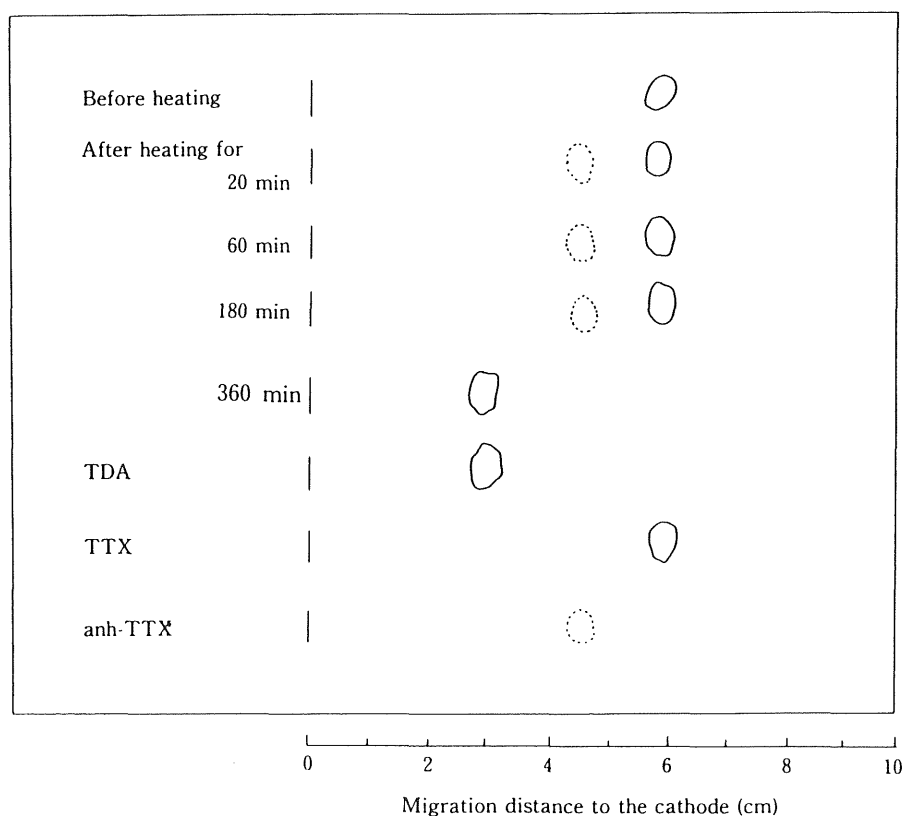


Fig. II —10. Electrophoresis of TTX solutions which were heated at 100°C for indicated periods.

Cellulose acetate membrane (Chemetron) was used.

Other conditions: 0.08M Tris-HCl buffer (pH8.7); 0.8mA/cm; 30min.

2. 肝臓の調理中における減毒機構

Fig. II-11 には、有毒トラフグの肝臓をフグ専門調理師が伝統的調理法によって処理した実際の試料を HPLC 分析した結果を示した(一例)。毒力は、マウス試験値を併記した。また、Fig. II-12 にこのときの減毒の様相をマウス毒性値で示し、上述した 1 の項の TTX の場合と比較した。

調理前と手揉み後とを比較すると、毒力はマウス毒性値で 71% に減毒したにもかかわらず、HPLC クロマトグラム上では TTX 及びその関連物質 (TDA、4-*epi*-TTX、anh-TTX) の量比は全く変化していない。このことは、手揉み工程での減毒は、前報でも述べたように TTX の溶出除去に基づくことを示している。

一方、1 回目の煮沸後の HPLC クロマトグラムでは、TTX の存在比率が減じ、TDA 及び anh-TTX のそれが増加する結果を得た。この間、毒力はマウス毒性値で 49% に減じた。これは上述した TTX の加熱実験結果と同様に、TTX → anh-TTX 変換と、それに引き続く TDA への変換による減毒を明確に示している。2 回目の煮沸以降ではさらにこの変換が顕著となり、5 回目の煮沸後では TDA のピークのみが検出されるようになった。この間、毒力は減少を続け、HPLC クロマトグラム上の TTX 及びそれに由来する関連物質への変換の挙動とよく一致した。

ところで、1 回目の煮沸工程では肝臓重量の顕著な減少(平均 56.5%、n=11)がみられ、これに伴う TTX の溶出も認められることを前節で述べた。2 回目以降の煮沸工程では肝臓重量がほとんど変化しなかったことから、これらの工程では肝臓中での TTX の変化によって減毒が進行するものと推測した。しかし、Fig. II-11 の HPLC クロマトグラム上では、4 回目の煮沸以後に明白な TDA の減少が認められた、他方、Fig. II-8 に示したように、6 時間に及ぶ長時間の 100℃加熱でも TDA は全く減少しなかった。また、有毒肝臓と TTX との減毒の様相を比較したところ、Fig. II-12 に示すとおり、2 回目以降の煮沸でも有毒肝臓の方が減毒傾向は明らかに顕著であった。これらの事実は、2 回目以降の煮沸工程においても、溶出による減毒が関与することを示唆し

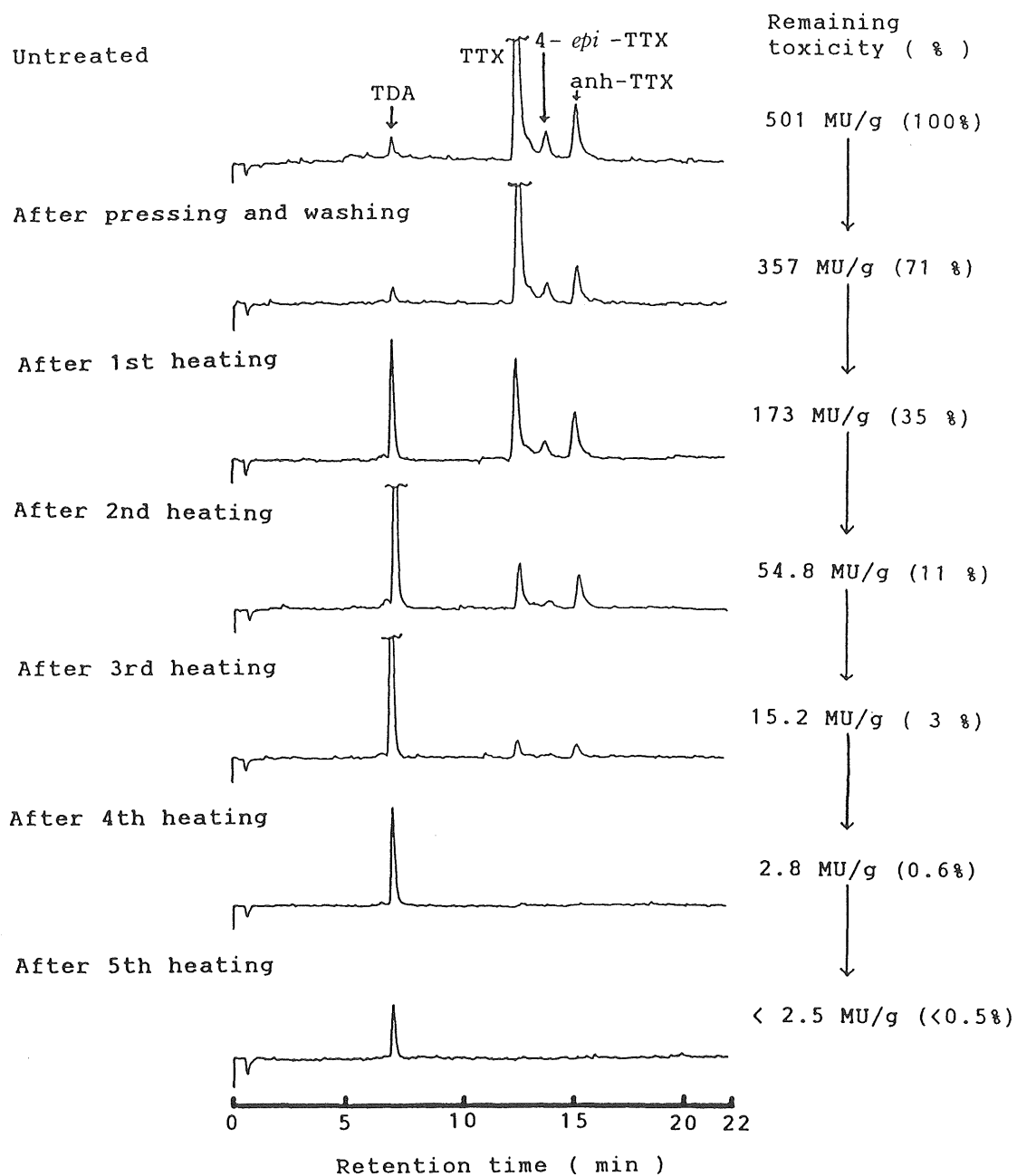


Fig. II —11. HPLC and mouse assay profiles of “Torafugu” liver toxin decomposed during the traditional cooking.

Sample was examined for TTX composition by Fuchi's method and for the remaining toxicity by the mouse assay method.

ている。

以上の結果から、フグ肝臓の伝統的調理の煮沸工程における減毒機構は、煮沸によって有毒肝臓中で $\text{TTX} \rightarrow \text{anh-TTX} \rightarrow \text{TDA}$ 変換が起こり、減毒するものであることが証明された。また、この煮沸工程では溶出による減毒も関与するものと考えられた。

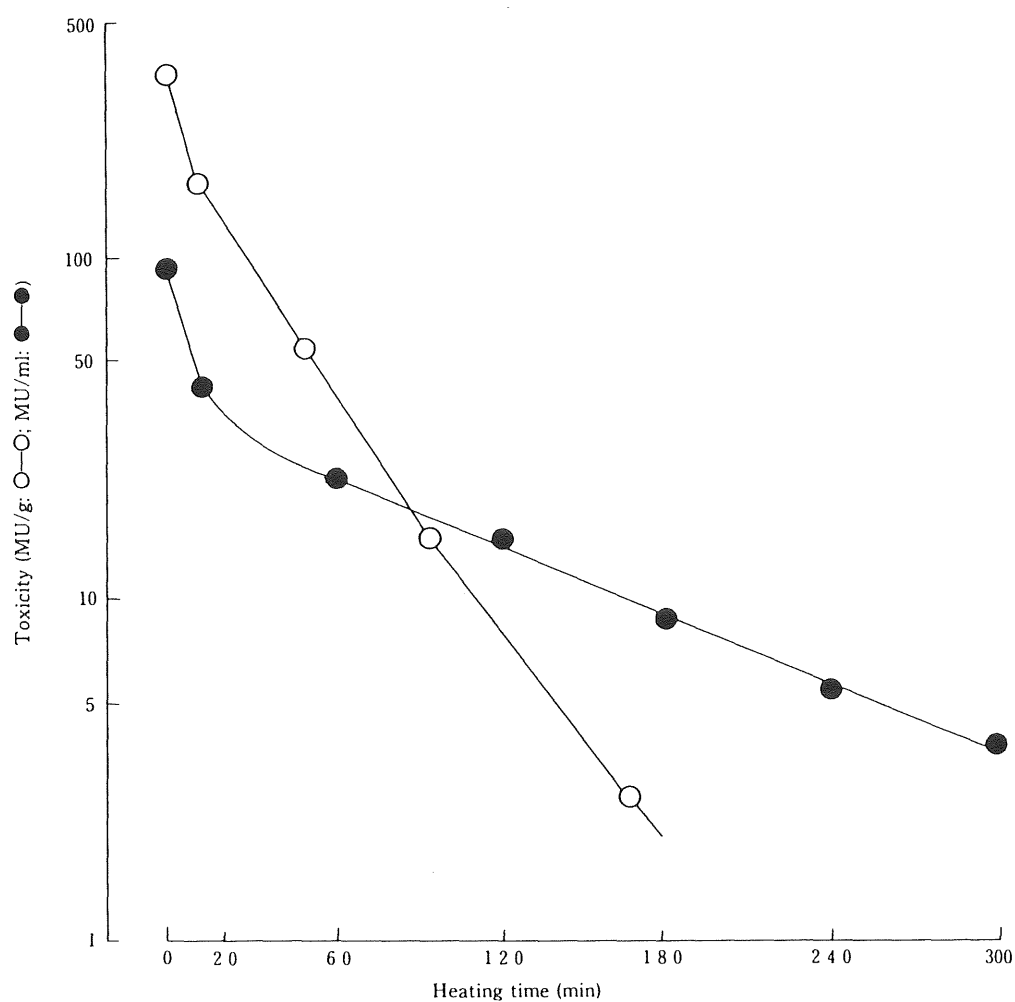


Fig. II-12. Decomposition of toxin of "Torafugu" liver (○—○) and a TTX solution (●—●) on heating at 100°C.

第4節 要 約

1. 1984年3月から1985年5月までに大分県内のフグ料理専門店及びフグ卸店に入荷したトラフグ242個体とカラス50個体の肝臓毒性について検討した。トラフグの肝臓は、雄の有毒個体出現率7.0%、最高毒力113 MU/g、最高総毒量76,900 MU、雌ではそれぞれ22.2%、1,270 MU/g、571,000 MUで、雄より雌の方が強毒性の性差を示した。トラフグの場合、肝臓毒力が1,000 MU/gを超える個体は極めて稀と考えられた。トラフグの肝臓重量と肝臓毒力の関係から、肝臓重量の大きいものの方が小さいものより毒性が強いことが示唆された。大分地方の「キモ料理」で使用されるトラフグは、通常1kg程度の小ぶりのものが多いといわれ、肝臓重量と毒性との関係が推察された。カラスの肝臓は、雄の有毒個体出現率15.8%、最高毒力66.0 MU/g、最高総毒量8,600 MU、雌ではそれぞれ9.7%、130 MU/g、14,200 MUで、明白な性差は認められなかった。トラフグ同様に肝臓の最高毒力が1,000 MU/gを超える個体は、カラスでも稀と考えられた。

2. 大分県内のフグ料理店における代表的な肝臓調理法の除毒効果について検討した。調理前の毒力が62~1,270 MU/gの有毒肝臓21検体について検討した結果、調理後の毒力はすべて5 MU/g未満で、厚生省の無毒基準(10 MU/g未満)を満足していた。調理工程ごとの毒力の推移では、肝臓毒力は各工程ごとに減少し、調理前の毒力の多寡にもよるものの、4回目あるいは5回目の煮沸工程後に5 MU/g未満まで減毒していた。特に、手揉み工程及び1回目の煮沸工程での除毒効果が著しく、この段階で約80~90%の毒量が除去されることがわかった。煮沸工程では、煮沸時間の増加に伴って、毒力が指数的に減少してゆく傾向を示した。

3. 大分地方の伝統的フグ肝臓調理法の減毒機構について検討した。手

揉み工程では、調理前と比較して TTX 及びその関連物質の量比に変化が認められなかったことから、この工程の減毒機構は毒の溶出除去であることが示された。煮沸工程の減毒機構は、加熱によって有毒肝臓中の TTX が anh-TTX、TDA へと順次構造変化を起こし、これに伴い毒性が弱毒性、無毒性へと転換変化する現象によるものであることを明らかにした。他方、この工程でも溶出除去による減毒機構が関与していることが推察された。

第3章 除毒によるフグ肝臓利用の検討

前章では、大分地方で提供されていた「キモ料理」について検討し、伝統的肝臓調理法の除毒効果、そのメカニズムを明らかにするとともに料理に使用されるフグ2種の肝臓毒性についても検討した。本章では、有毒肝臓を加工処理する場合に必要な諸点の検討と併せて、伝統的調理法よりも更に効率的な除毒方法について検討した。前章に引き続いて、有毒部位であるフグ肝臓の加工による利用を目的とした研究である。

第1節では、有毒肝臓における毒の分布について検討した。有毒肝臓中の毒の分布が部位によって相違するかどうかは、これまで調べられていない。本節での検討は、フグ肝臓の加工処理を目的としたが、現行のフグ毒検査法での肝臓採取部位についても考察した。後者は、食中毒時の残品検査のように、限られた量の検体から患者の摂取毒量を推定する際に必要な検討である。

第2節では、伝統的調理法中の煮沸工程について検討した。加熱時の液性、加熱温度を変化させることで減毒の様相が異なるかどうかを、TTX 水溶液及び有毒肝臓を用いて調べた。また、煮沸工程における減毒傾向から、毒性消失までに必要な加熱時間を推定する回帰式を算定した。

第3節では、大分地方の伝統的調理法に不可欠な調理工程を明確にするとともに、より効率的な除毒方法について検討した。また、除毒の限界についても推察した。

第1節 有毒肝臓における毒の分布

臓器中のフグ毒の分布については、トラフグの卵巣及び両性フグの生殖腺に関する報告(末兼と八木, 1970; 北濱, 1984)があるが、肝臓中の毒の分布を調べた報告はまだない。本節では、有毒肝臓中の毒の分布を調べて、フグ肝臓の加工利用に資そうとした。他方、本節での検討は、現行のフグ毒検査に用いられる検体の採取部位や採取量にも関係し、殊に食中毒時には患者の喫食残品は少量なことが多く、摂取毒量を推定するときに必要なデータと考えた。

試料及び方法

肝臓の一部を用いた毒性スクリーニングで有毒と判定されたトラフグ6個体(11~280 MU/g、161~827g)、カラス1個体(29 MU/g、173g)及びコモンフグ3個体(17~30 MU/g、18~31g)の肝臓を試料として、毒の分布を検討した。毒性スクリーニングは、肝臓の消化管側の上先端(以下、上端と記す)を約5~15g採り、毒性試験に供して選別した。毒性の分布試験は、有毒肝臓をその大きさに応じて分割した後、各切片ごとに毒性試験に供した。一部の試料については、肝臓の内層と外層別に分けて毒性試験に供した。毒性試験は、「食品衛生検査指針Ⅱ」中のフグ毒検査法(厚生省, 1978)に従って行った。また、毒性試験はマウスを用いる生物試験法であることから、約20%の変動誤差(厚生省, 1978)があるものとして取扱い、測定した毒力値を評価した。

結果及び考察

1. トラフグ及びカラスの有毒肝臓における毒の分布

トラフグとカラスの有毒肝臓を用いた検討結果を、Fig. III-1 及び Fig. III

-2 に示した。トラフグの肝臓(重量 161~189 g、毒力 11~37 MU/g)を用いて、分割した各切片(10~42 g)の毒力の変動をみた結果を Fig. III-1 に示したが、変動係数(C.V.)は A 肝臓が 20.4% (n=4)、B 肝臓が 8.8% (n=8)、C 肝臓が 16.2% (n=8)であった。B と C の肝臓については、切片を内層と外層に分けて検討したが、A が 8.2% (n=4)、B が 18.0% (n=4)の変動係数を示した。マウスを用いた生物学的測定法であることを考慮すると、いずれも測定誤差の範囲内と考えられた。

次に、トラフグの肝臓(重量 246~827 g、毒力 42~278 MU/g)とカラスの肝臓(重量 173 g、毒力 29 MU/g)を用いて検討した結果を Fig. III-2 に示した。各肝臓毒力の変動係数はトラフグ D が 41.2% (n=23)、同 E が 40.1% (n=9)、同 F が 24.0% (n=8)、カラス F が 25.5% (n=8)であった。図中に示すとおり、4 つの肝臓とも消化管側と反対の下端部位(以下、下端部と記す)の毒力が、他の部位と比較して低値を示した。トラフグ D と E ではこの傾向が顕著で、特に D 肝臓の下端部の 2 切片(計 13g)は毒性が全く検出されず、他の切片の毒力が 159 ± 23 MU/g(S.D.)を示したことと比べて際立っていた。低毒力を示した下端部を除く各肝臓の毒力の変動係数は、D が 14.2% (n=22)、同 E が 6.6% (n=8)、同 F が 9.6% (n=7)、カラス F が 8.6% (n=7)で、いずれも測定誤差の範囲内と考えられた。低毒性の下端部が肝臓全体に占める割合は、D が 6.5%、同 E が 6.1%、同 F が 1.8%、カラス F が 1.3%であった。有毒肝臓の下端部が低毒性を示す理由については検討しなかったが、肝臓重量の大きいものでこの現象が明らかであり、毒力差も著しいように思われた。

2. コモンフグの有毒肝臓における毒の分布

Fig. III-3 には、コモンフグの有毒肝臓(重量 18~31 g、毒力 17~30 MU/g)について検討した結果を示した。各肝臓切片の毒力の変動係数は、H が 14.9% (n=4)、I が 17.8% (n=4)、J が 11.5% (n=3)で、いずれも測定誤差の範囲内と考えられた。

以上の結果から、有毒肝臓においては下端部を除く他の部位の毒力は、

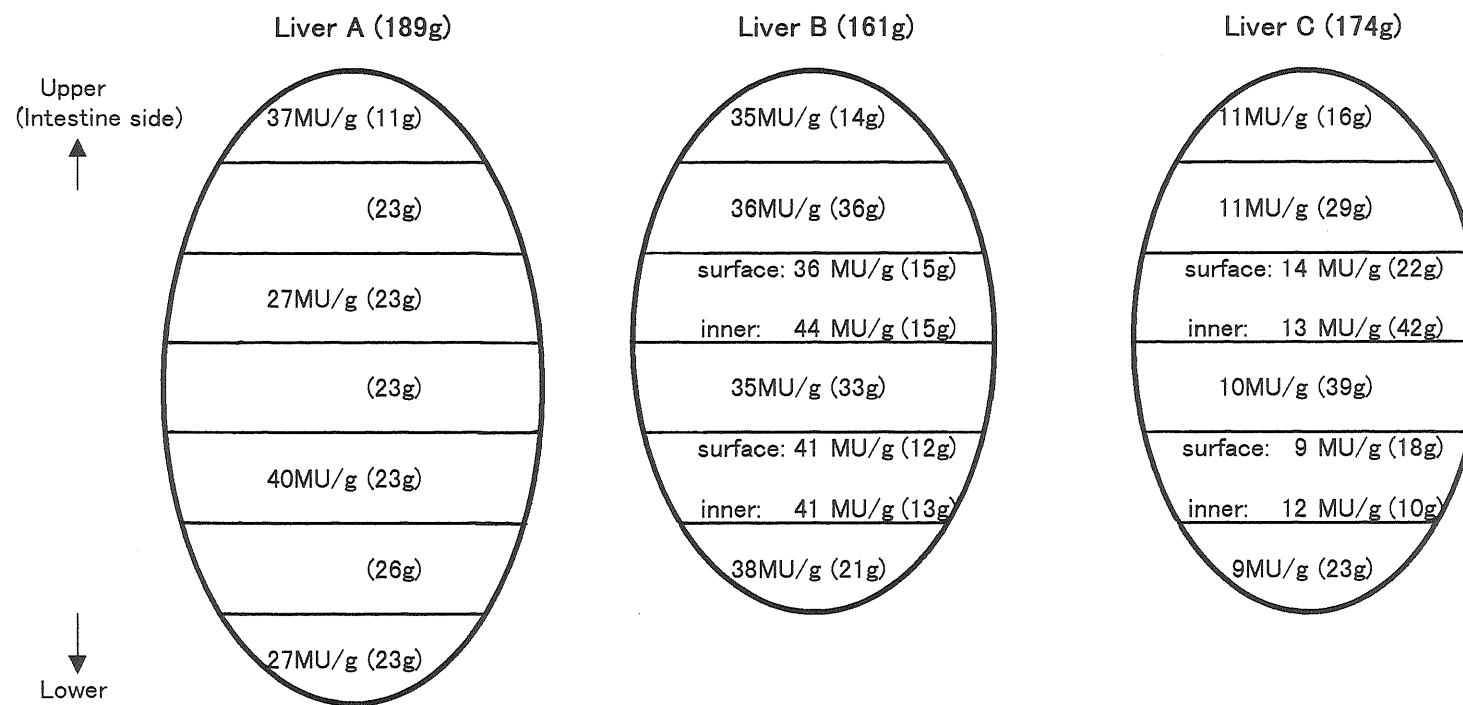


Fig. III-1. Toxin distribution (MU/g) in each part of "Torafugu" liver.

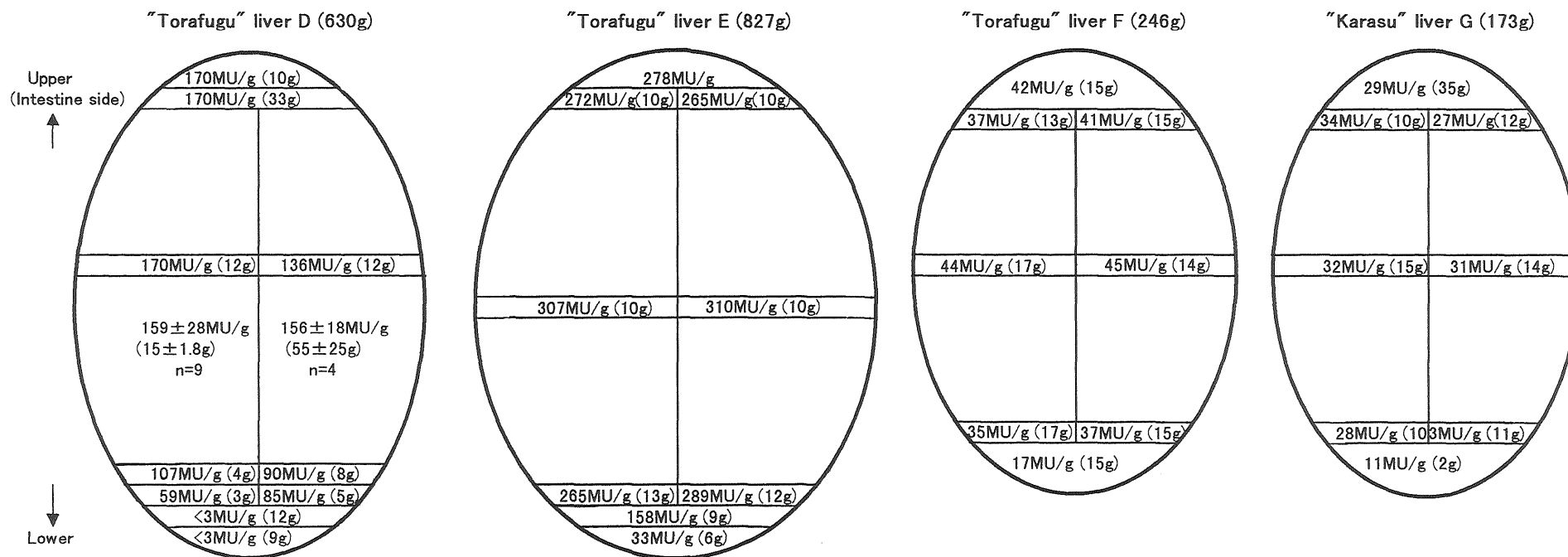


Fig. III-2. Toxin distribution (MU/g) in each part of "Torafugu" liver over 200g and "Karasu" liver.

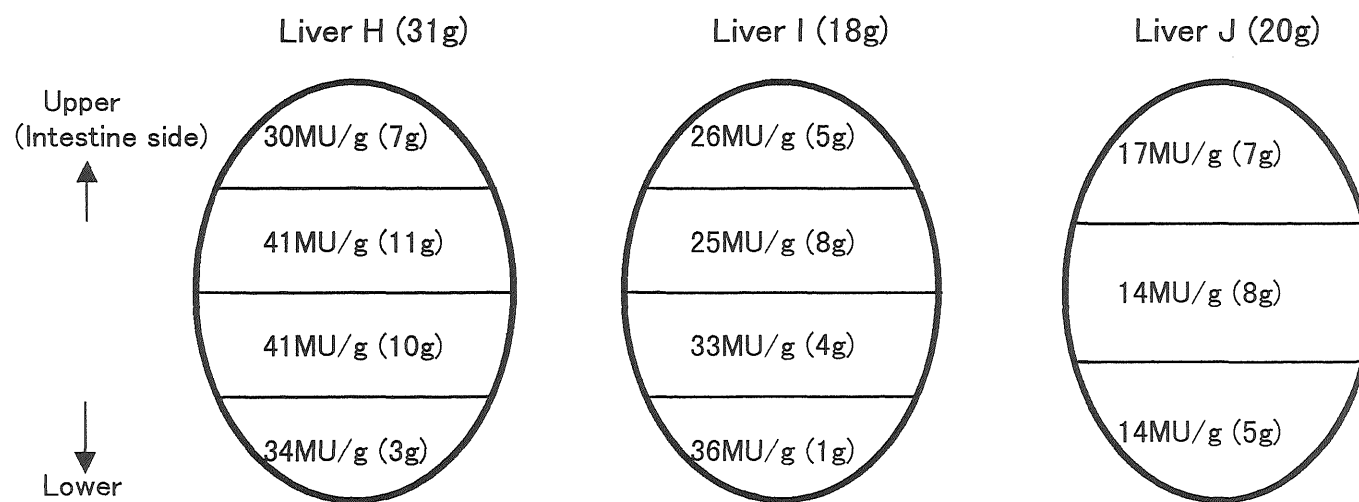


Fig. III-3. Toxin distribution (MU/g) in each part of "Komonfugu" liver.

ほぼ均一に分布すると考えられた。また、低毒性を示す下端部の重量比は、この現象が著しい肝臓重量の大きいものでも 10%程度と推察された。このことから、有毒肝臓を用いる除毒効果の検討には、下端部を除く必要があると考えられ、本論文中の調理による除毒実験には肝臓の両端部をそれぞれ 10%以上切除したものを使用した。関連して、現行のフグ毒検査法(厚生省, 1991)の試料採取に際しては、以上の点に留意する必要があると思われた。

第2節 フグ毒の加熱による減少と減毒推定式

第2章で、大分地方のいわゆる「キモ料理」調理法を検討し、長時間の煮沸で有毒肝臓の毒性が徐々に減少することを明らかにした。従来、フグ毒は加熱に対してアルカリ性で不安定、中性及び微酸性で安定であるといわれている(厚生省, 1991)。しかし、著者らがこの肝臓調理法の煮沸工程で認めた毒性の減少は、フグ毒の熱安定性に関する従来(福田, 1936; 城田ら, 1952; 津田, 1967; 末兼と八木, 1970)にはみられないほど著しいものであった。

本節では、中性及び酸性域でのフグ毒の加熱による影響を検討するとともに、トラフグの有毒肝臓を用いた加熱実験を行った。また、肝臓調理法の煮沸工程における減毒推定式を案出し、加熱実験に基づいて有毒肝臓の無毒化に要する加熱時間を推定した。

試料及び方法

1. 試料及び試験法

1. 1 供試フグ

供試フグとして、九州近海産トラフグ *Takifugu rubripes* の有毒肝臓2個体を用いた。それらの毒力はフグ毒検査法に従って測定した結果、それぞれ 330 MU/g 及び 390 MU/g であった。

1. 2 試薬

1) TTX : 三共製 TTX 標品 1 mg (クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液入り、pH 4.8-4.9) を蒸留水で希釈し、TTX 標準液として用いた。

2) Anh-TTX : マフグの肝臓から NARITA ら(1981)に準じて精製したものを用いた。

3) TDA : 津田(1967)に従って、TTX の水溶液を 100℃で 8 時間以上加熱して

生成させたものを用いた。

4)その他の試薬：高速液体クロマトグラフ用または特級品を用いた。

1. 3 試験法及び装置

1)マウス試験法：「食品衛生検査指針(理化学編)」中のフグ毒検査法(厚生省, 1991)に従った。

2)高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析：著者ら(第4章)の方法に従って分析した。

高速液体クロマトグラフは日本分光工業製 TRI ROTER SR 型を、蛍光検出器は同社製 FP-110-D 型を用いた。

3)オートクレーブ：トミー精工製 SS-240 型を用いた。

2. 実験方法

2. 1 有毒肝臓抽出液の加熱実験

(1) 抽出液の調製

トラフグの有毒肝臓(毒力 330 MU/g)約 140 g を細切した後、佐久間製作所ホモジナイザー 500D-2 型でホモジナイズした。これに 1.5 倍量の精製水を加え沸騰水浴中で 5 分間抽出した。1,700×g で 15 分間遠心分離した後、上清を吸引ろ過した。ろ液を 8,400×g で 20 分間遠心分離した後、上清を東洋濾紙 No.2 でろ過し、247 MU/ml の抽出液 168 ml を得た。この抽出操作による毒力を指標とした回収率は、89.8%であった。

1)中性抽出液：上記の抽出液 35 ml に精製水 40 ml を加え、中性域での加熱実験に供する試験溶液とした。この試験溶液は pH 6.8、毒力 106 MU/ml を示した。以下には、この試験溶液を中性抽出液という。

2)酸性抽出液：上記の抽出液 35 ml に 0.2%酢酸 30 ml を加えた後、5%酢酸で pH 4.0 に調整した。これに精製水を加え全量を 75 ml として、酸性域での加熱実験に供する試験溶液とした。この試験溶液は 115 MU/ml の毒力を示した。以下には、この試験溶液を酸性抽出液という。

(2) 加熱の方法

供試液を 500 ml の二頸フラスコに入れ、以下に示す 1)直火及び 2)水浴

の方法で加熱した。二頸フラスコにはジムロート冷却器を装着して還流し、一定時間ごとに供試液の温度を測定すると共に 3~5 ml ずつサンプリングした。サンプルはただちに室温まで冷却した後、毒性試験法に従って加熱時間と毒力変化の関係について調べた。なお、加熱終了時の供試液の量は加熱前の 50% 以上が残るように留意した。

1) 直火加熱法：供試液を入れた二頸フラスコをアスベスト上で直火加熱した。加熱開始後約 6 分で供試液は沸騰し、加熱 10 分以後は温度が終始 100~104℃を示した。以下には、この方法を直火加熱法という。

2) 水浴加熱法：供試液を入れた二頸フラスコを沸騰水浴中で加熱した。加熱開始後約 8 分で供試液の温度は 90℃に達し、その後は 90~93℃の範囲にあった。以下には、この方法を水浴加熱法という。

2. 2 TTX 標品水溶液の 120℃加熱実験

(1) 標品水溶液の調製

シグマ社製の TTX 標品 (TTX 1 mg に pH 4.8 のクエン酸緩衝液 5mg を含むもの) を精製水 10 ml に溶かし、毒力 495 MU/ml の標品原液を調製した。

1) 中性 TTX 標品液：上記の標品原液に 5 倍量の精製水を加えて、中性域での加熱実験に供する試験溶液とした。この試験溶液は pH 7、毒力 99 MU/ml を示した。以下には、この試験溶液を中性 TTX 標品液という。

2) 酸性 TTX 標品液：上記の標品原液に 0.2% 酢酸溶液を加えた後、5% 酢酸で pH 4.0 に調整し、全量を 5 倍量とした。この試験溶液は 99 MU/ml の毒力を示した。以下には、この試験溶液を酸性 TTX 標品液という。

(2) 加熱の方法

供試液 10ml を 25 ml の試薬瓶に入れ、オートクレーブ中 120℃で加熱した。すなわち、各加熱時間ごとの供試液入り試薬瓶を、あらかじめ沸騰状態にしておいたオートクレーブにいれ、加熱後直ちに減圧してとり出し室温まで冷却した。また、比較に行った 100℃加熱は、上記 2. 1(2) の 1) 直火加熱法に従った。毒性試験法に従って加熱時間と毒力変化の関係を調べるとともに、HPLC 分析に供した。

2. 3 トラフグ有毒肝臓の 120℃加熱実験

約 10g の切片に細切したトラフグの有毒肝臓(毒力 390 MU/g)を用いて、約 10 倍量の水で加熱した。120℃のオートクレーブ加熱は、肝臓切片 3 個ずつをそのまま各試薬瓶 500 ml に入れ、水を加えて上記 2. 2 (2)の方法に従って加熱した。煮沸加熱は、肝臓調理法に従って手揉みした肝臓切片(煮沸前毒力 270 MU/g)を用いた。毒性試験法に従って、両者の加熱時間と毒力変化の関係について調べた。

結果及び考察

1. 有毒肝臓抽出液の加熱実験

大分地方の伝統的肝臓調理法の煮沸工程は、細切したフグの肝臓を調理鍋に入れ十分な水を加えてガスコンロ上で、5 回にわたり延 3 時間余り煮沸することであった。このときの煮沸水の液性は中性域(pH 7.5)にあり、温度は 100~104℃であった。そこで、中性域及び酸性域の肝臓抽出液について直火及び水浴加熱法による加熱実験を行い、水溶液中のフグ毒の熱による影響を検討した。なお、あらかじめ行った予備試験で、アルカリ性域(pH 10)の肝臓抽出液は水浴加熱により 5 分以内に毒性を消失したので、加熱実験に供しなかった。

Fig. III-4 に結果を示した。中性抽出液では両加熱法とも加熱直後から毒力の減少が認められ、加熱 30 分後の減毒率は直火加熱法 68.2%、水浴加熱 43.2%で、180 分後にはそれぞれ 99.0%及び 84.8%に達した。pH は、両加熱法とも加熱前 6.8 に対し加熱後 6.7 でほとんど変化しなかった。一方、酸性抽出液では両加熱法とも加熱開始から 10 分間は毒力に変化を認めなかったが、その後減毒が始まり、加熱 30 分後の減毒率は直火加熱法 25.8%、水浴加熱法 17.4%で、180 分後ではそれぞれ 60.1%及び 27.0%であった。加熱前後の pH は 4.0 で、両加熱法とも全く変化しなかった。図中のいずれの方法とも加熱 20 分までの減毒が特に著しいが、この理由は前章で明らかに

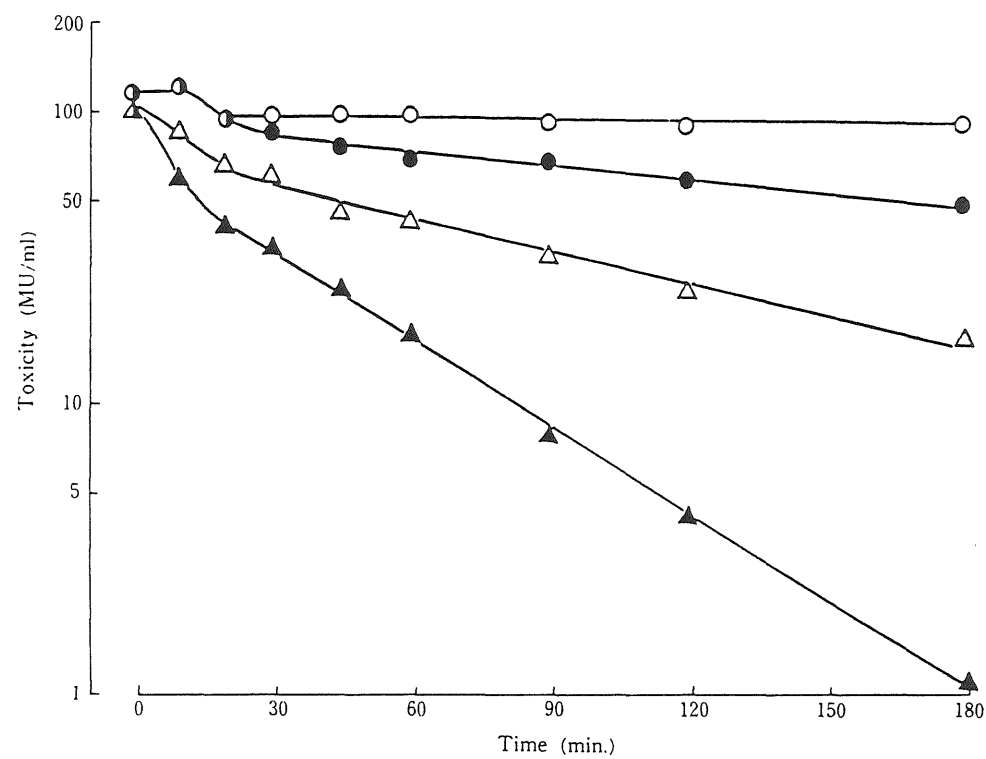


Fig. III—4. Decomposition of toxin of "Torafugu" liver during heating.

- , Acid extract heated to boil in water bath.
- , Acid extract heated to boil directly.
- △—△, Neutral extract heated to boil in water bath.
- ▲—▲, Neutral extract heated to boil directly.

されたように TTX→anh-TTX 変換が進行した結果、比毒性が 500 分の 1 に減少する急激な毒性の変化が起るためと考えられる。

次に、減毒率がほぼ一定となる加熱 20 分以後について、加熱 20 分後の残存毒力を 100 としたときの加熱 180 分後の減毒率を比較すると、中性抽出液では直火加熱法が 97.3% で水浴加熱法が 75.0% に対し、酸性抽出液ではそれぞれ 51.2% 及び 9.8% であった。加熱 20 分以後の減毒は、主に anh-TTX→TDA 変換に基づいて一定の減毒率を示すと考えられる。

このように、水溶液中のフグ毒は加熱時の液性及び温度によって強く影響を受けた。従来報告(福田, 1936; 城田ら, 1952; 津田, 1967; 末兼と八木, 1970)によれば、100℃で 30 分間加熱したときの減毒率は 17% ないし 20% とされている。実験条件が異なるため直接の比較はできないが、これらの減毒率に最も近似していたのは、著者らの実験条件では酸性抽出液と水浴加熱法の組合せであった。他の条件ではいずれも 25% 以上の減毒率を示し、特に中性抽出液を直火及び水浴加熱したときの減毒率 68.2% 及び 43.2% は、従来の報告をはるかに上回るものであった。

以上の結果から、加熱時の液性及び温度によって、水溶液中のフグ毒は従来いわれているほど熱に安定でないことが示された。

2. TTX 標品液の 120℃加熱実験

これまでの研究から水溶液中のフグ毒は必ずしも熱に安定でないことが分かったので、中性(pH 7)及び酸性(pH 4)の TTX 標品液を用いて、より高温の 120℃でオートクレーブ加熱した結果を Fig. III-5 に示した。また、このときの HPLC 分析結果を Fig. III-6 及び Fig. III-7 に示した。図中には、同時に行った中性 TTX 標品液の 100℃加熱結果を併記した。関連して、TTX 及び anh-TTX は 4,000 atm、60 分間の高圧処理によっても毒性が変化しないとされている(長島ら, 1988)。

99 MU/g の中性 TTX 標品液を 120℃で加熱すると、毒力の残存率は 5 分後 47%、20 分後 21%、50 分後 7% で、120 分後には毒性が消失した。一方、

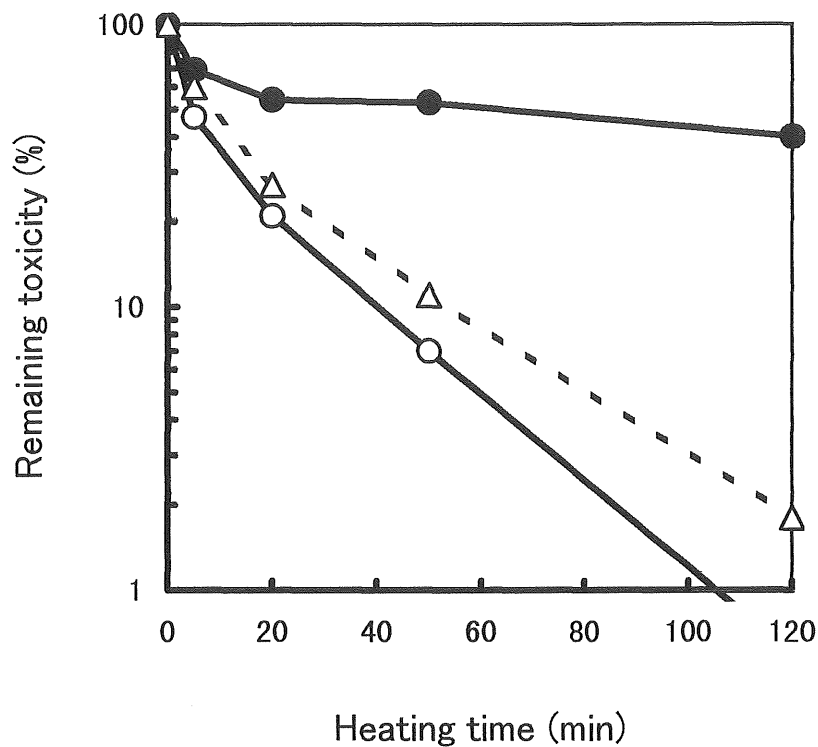


Fig. III-5. Decomposition profiles of a pH 7-TTX solution (○—○) or a pH 4-TTX solution (●—●) on autoclaving at 120°C, and a pH 7-TTX solution (△···△) on boiling.

同じ中性 TTX 標品液を 100℃で加熱したときの毒力残存率は、それぞれ 55%、25%、11%、1.8%で、各加熱時間とも 120℃のときより高かった。酸性 TTX 標品液を 120℃で加熱したときの毒力残存率は更に高く、それぞれ 69%、54%、53%、40%で推移した。

120℃加熱での中性及び酸性 TTX 標品液の HPLC クロマトグラムは、上記の毒性推移を裏付けていて、中性 TTX 標品液では TTX→anh-TTX→TDA 変換が顕著であるのに対し、酸性 TTX 標品液では TTX→anh-TTX 変換の進行が遅く、引き続く anh-TTX→TDA 変換がほとんどみられなかった。加熱 120 分後の HPLC クロマトグラム上には未知のピークが認められ、酸性下の TTX の加熱変化は、中性下のそれとは明らかに様相が異なっていた。

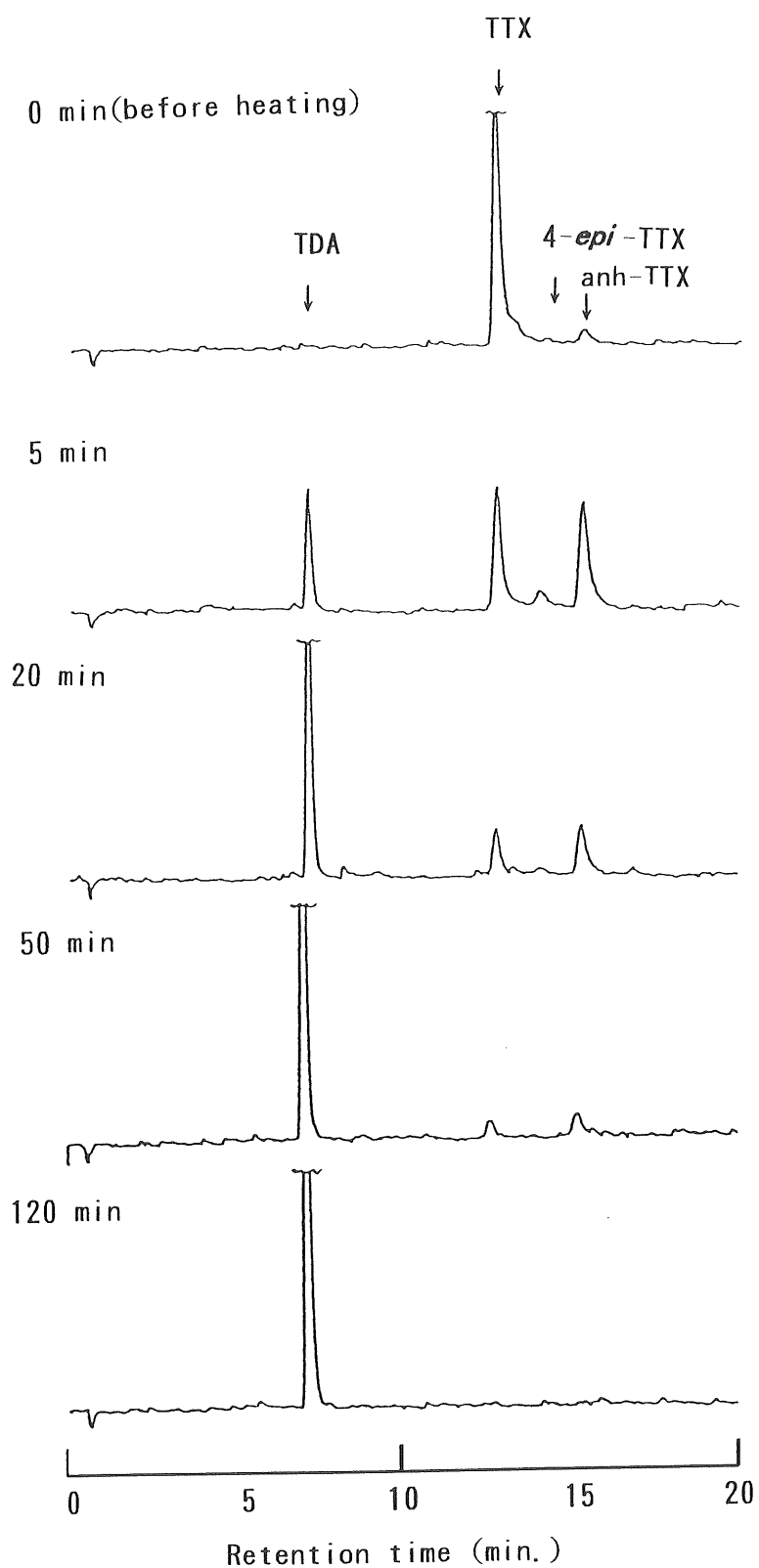


Fig. III-6. HPLC analyses of TTX standard solution adjusted to neutral pH for TTXs on autoclaving at 120°C for 5-120 min.

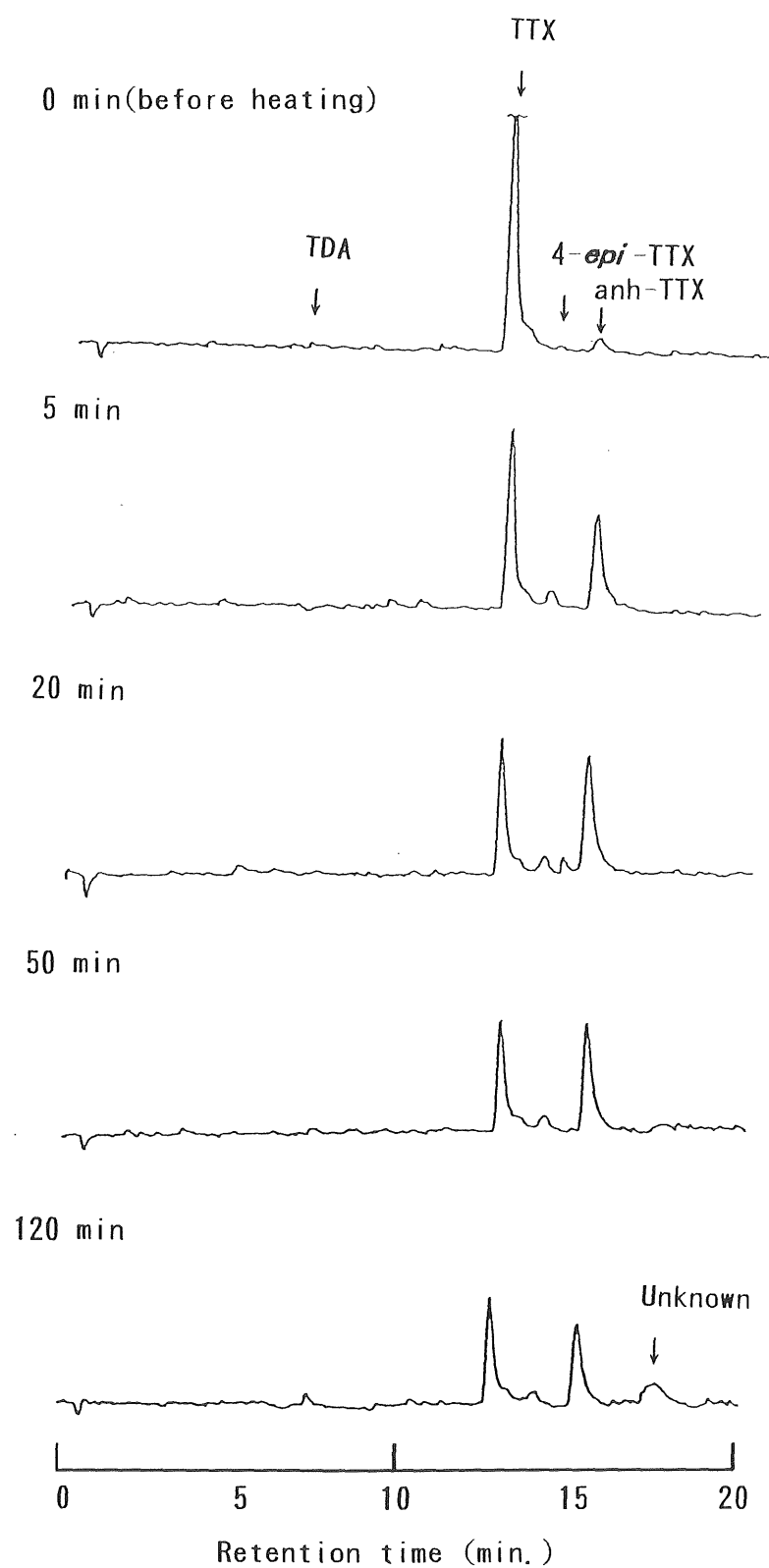


Fig. III—7. HPLC analyses of TTX standard solution adjusted to acidic pH for TTXs on autoclaving at 120°C for 5–120 min.

3. トラフグ有毒肝臓の 120℃加熱

TTX 標品液の実験で、中性下水溶液中の 120℃加熱が肝臓調理法の煮沸加熱より除毒効果が高いと考えられたので、トラフグの有毒肝臓を用いて 120℃オートクレーブ加熱した結果を Fig. III-8 に示した。肝臓調理法に従って手揉み後に煮沸加熱した結果を、比較のため併記した。毒力 390 MU/g のトラフグ肝臓を 120℃で加熱すると、毒力の残存率は 20 分後 25%、60 分後 8%、120 分後 2%で、180 分後には毒性の検出限界未満となった。一方、手揉み後の肝臓(毒力 270 MU/g)を煮沸加熱したときの毒力の残存率は、それぞれ 49%、17%、4.2%、1.4%を示した。各加熱時間とも 120℃加熱の方が煮沸加熱より高い減毒率で推移した。

以上の結果から、120℃のオートクレーブ加熱は、肝臓調理法の煮沸加熱よりも効果的な除毒方法であることが明らかになった。高温加熱法として缶詰加工技術を用いるなどの方法により、本来、有毒部位であるフグの肝臓を食品として有効利用できる可能性が示された。

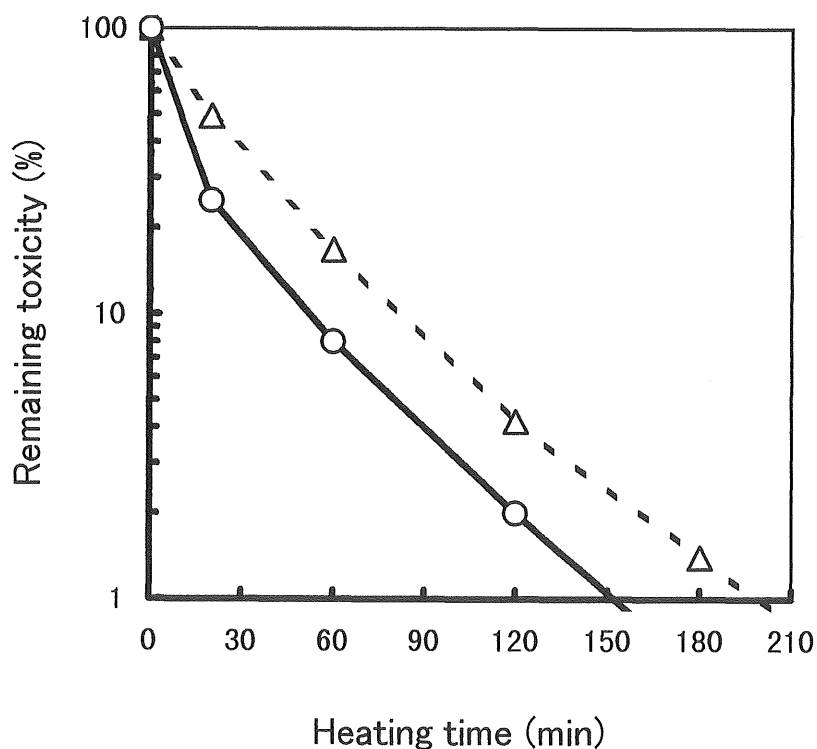


Fig. III-8. Decomposition of "Torafugu" liver toxin on autoclaving at 120°C (○—○), or on boiling (△···△) by the traditional cooking.

4. 肝臓調理法の煮沸工程における減毒推定式

有毒肝臓抽出液の加熱実験のうち中性域・直火加熱の組合せは、フグ肝臓調理法の煮沸工程と液性及び加熱条件が一致しており、煮沸工程と同じ条件下の実験と考えられる。

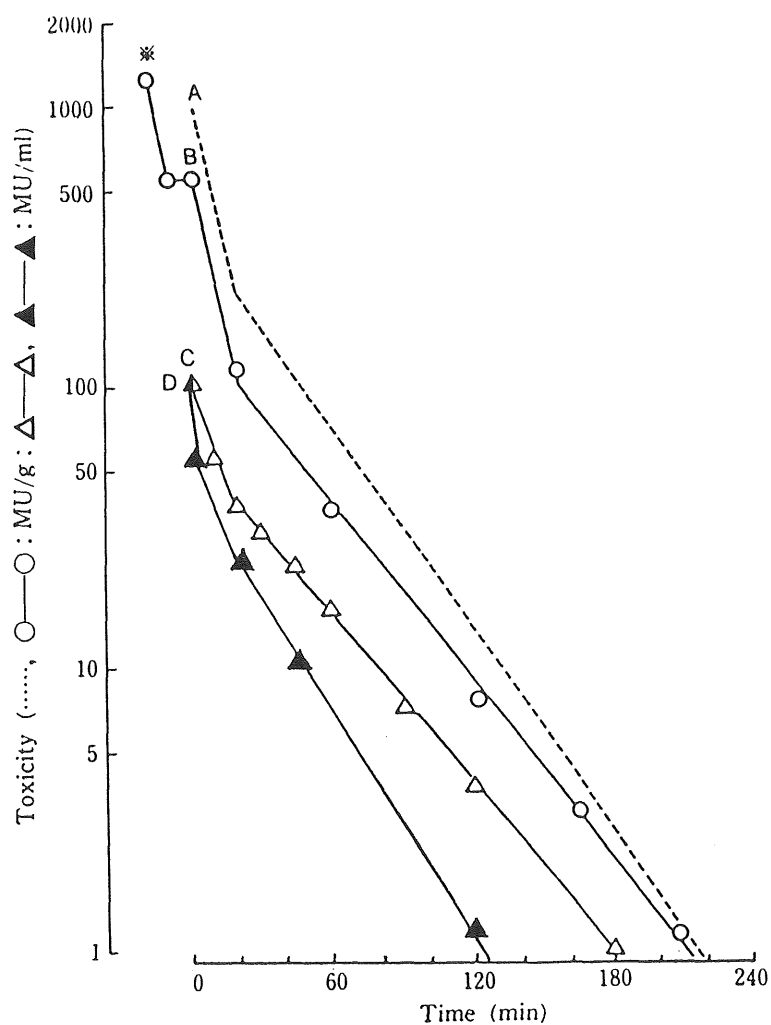


Fig. III-9. Detoxification of TTX extract from liver and standard TTX preparation by heating up to boiling point.

A:....., Removal of toxicity by cooking estimated.

B:○—○, A sample with maximum toxicity in liver extract treated by cooking.

C:△—△, Neutral extract heated to boil directly.

D:▲—▲, Standard TTX solution heated to boil directly.

※: Toxicity of a material (※) indicated 1,270 MU/g was decreased by hand-press and rinse in running water before examination of heating to boil.

そこで、肝臓調理法で有毒肝臓を調理した 21 例のうち、全調理工程ごとの毒力を測定することができた 11 例(調理前の毒力 112 MU/g~1,270 MU/g)の煮沸工程における除毒の回帰式を求め、これら回帰式の傾きを平均して、煮沸前の毒力 1,000 MU/g からの調理除毒回帰線を推定した。この推定による調理除毒回帰線、最高有毒肝臓(1,270 MU/g)を調理したときの除毒回帰線、中性抽出液及び TTX 標品液を直火加熱したときの減毒回帰線のそれぞれを Fig. III-9 に示した。また、これら除毒及び減毒回帰線の傾き(後述する関係式の定数 a_0 及び a_{20})を Table III-1 に示した。なお、図中の最高有毒肝臓の除毒回帰線では、毒力 564 MU/g から煮沸が開始されている。これは、肝臓調理法に従って皮剥ぎ・細切・手揉み・水晒し処理した後の毒力 748 MU/g に、このときの肝臓重量減少比 75.4% を乗じて算出した補正毒力を表している。

加熱による減毒が熱依存性の一次反応であるとする、加熱時間と毒力との間には次式が成立する。

①加熱 20 分まで ($t \leq 20$)

$$\log [\text{MU}] = -a_0 \cdot t + \log [b_0]$$

②加熱 20 分以後 ($t > 20$)

$$\log [\text{MU}] = -a_{20} (t - 20) + \log [b_{20}]$$

MU : 加熱 t 分後の毒力

t : 加熱時間 (分)

b_0 : 加熱前の毒力

b_{20} : 加熱 20 分後の毒力

ただし、この式でいう毒力とは、肝臓調理法では毒力に肝臓重量比を乗じて算出した補正毒力値を示す。

そこで、関係式の定数 a_0 及び a_{20} を調理による除毒 11 例から求めたところ、 $a_0 = 3.25 \times 10^{-2} \pm 1.32 \times 10^{-2}$ 、 $a_{20} = 1.18 \times 10^{-2} \pm 0.28 \times 10^{-2}$ と算定された (Table III-1)。このように、肝臓調理法においては煮沸前の肝臓毒力を知ることにより、毒性消失までの煮沸時間を推定することも可能と思われる。

Table III — 1. Slant constant of "a₀" and "a₂₀" on detoxification by heat to boiling

Heat times (t)	t ≤ 20 min			t > 20 min		
Equations	Log[MU] ^{a)} = -a ₀ ·t + Log[b ₀] ^{b)}			Log[MU] ^{a)} = -a ₂₀ (t-20) + Log[b ₂₀] ^{c)}		
Slant constant	"a ₀ "	r	n	"a ₂₀ "	r	n
Estimated removal of toxicity	3.25 × 10 ^{-2 d)} ± 1.32 × 10 ⁻²	—	—	1.18 × 10 ^{-2 d)} ± 0.28 × 10 ⁻²	—	—
Maximum of toxicity in liver	3.38 × 10 ⁻²	-1.00	2	1.04 × 10 ⁻²	-0.998	5
Neutral extract	2.11 × 10 ⁻²	-0.990	3	0.99 × 10 ⁻²	-0.999	7
Standard TTX reparation	2.84 × 10 ⁻²	-0.988	3	1.18 × 10 ⁻²	-0.999	3

Remarks: The sign of number in parenthesis appeared in the column of "Equations" and "Estimated removal of toxicity" means respectively as follows:

a) Toxicity: after heating.

b) Toxicity: before heating.

c) Toxicity: after heating for 20 minutes.

d) Values: mean ± standard deviation (S.D.).

第3節 効率的な除毒方法の検討

本節では、前節で確認した加熱による減毒以外で、除毒効果のあるフグ肝臓調理法の調理工程を明確にするとともに、これまでの研究結果に基づいてより効率的な除毒方法について検討を行った。また、肝臓調理法及び 120℃オートクレーブ加熱の除毒の限界についても考察した。

試料及び方法

1. 試料及び試験法

1. 1 供試フグ

供試フグとして、九州近海産トラフグ *Takifugu rubripes* の有毒肝臓 6 個体を用いた。それらの毒力はフグ毒検査法に従って測定した結果、それぞれ 83 MU/g、170 MU/g、220 MU/g、310 MU/g、350 MU/g 及び 390 MU/g であった。

1. 2 試薬

1) TTX : 三共製 TTX 標品 1 mg (クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液入り、pH 4.8-4.9) を蒸留水で希釈し、TTX 標準液として用いた。

2) Anh-TTX : マフグの肝臓から NARITA ら (1981) に準じて精製したものを用いた。

3) TDA : 津田 (1967) に従って、TTX の水溶液を 100℃ で 8 時間以上加熱して生成させたものを用いた。

4) その他の試薬 : 高速液体クロマトグラフ用または特級品を用いた。

1. 3 試験法及び装置

1) マウス試験法 : 「食品衛生検査指針 (理化学編)」中のフグ毒検査法 (厚生省, 1991) に従った。

2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析 : 著者ら (第 4 章) の方法に従っ

て分析した。

高速液体クロマトグラフは日本分光工業製 TRI ROTER SR 型を、蛍光検出器は同社製 FP-110-D 型を用いた。

2. 除毒効果試験

上記のトラフグの有毒肝臓 6 個体 (83~390 MU/g) を用いて大分地方の肝臓調理法の細切工程、手揉み工程、煮沸工程の除毒効果について検討した。一部の試料については、HPLC 分析を行って毒成分組成の変化を調べた。

2. 1 細切のサイズ

有毒肝臓 (細切後の毒力 390 MU/g) を細切りして、伝統的調理法の通常サイズの切片 (12.0 ± 2.3 g、切片数 6)、その 4 分の 1 分割切片 (3.4 ± 1.0 g、切片数 24) 及び通常サイズの約 4 倍重量切片 (39.2 ± 2.1 g、同 3) の 3 つのサイズを調製し、細切のサイズが、以下の調理工程で除毒効果に及ぼす影響を検討した。手揉み工程では 3 分間手揉みし、煮沸工程では 40 分間煮沸してサイズ別による毒力の相違を調べた。煮沸工程は煮沸途中の 20 分後の毒力も調べた。

次に、手揉み工程を省略してサイズ別の切片をそれぞれ直接煮沸し、上記と同様にして毒力の相違を調べた。この検討には有毒肝臓 (細切後の毒力 83 MU/g) を細切りして、 28 ± 3.1 g の切片 (切片数 3)、その 4 分の 1 分割切片 (6.5 ± 1.5 g、同 12) 及び 16 分の 1 分割切片 (1.4 ± 0.6 g、同 48) の 3 サイズを調製して用いた。

2. 2 手揉み

1) 手揉みの熟練度：約 10g のサイズに細切した毒力 220 MU/g の肝臓を用い、伝統的調理法の手順に従って専門調理師と素人がそれぞれ 3 分間手揉みした。各々の毒力を比較して、手揉みの熟練度の違いによる除毒への影響を調べた。

2) 手揉み時間：3 個体の有毒肝臓 (細切後の毒力 220、310、350MU/g) をそれぞれ約 10g のサイズに細切した切片を用いて、3 分、6 分、9 分間手揉みした後、各手揉み時間別の毒力を比較した。手揉みは専門調理師が行った。

2. 3 煮沸

1) 煮沸水量：約 10g のサイズに細切した煮沸前毒力 220 MU/g の肝臓切片を用いて、肝臓重量の 5 倍、10 倍及び 100 倍量の水でそれぞれ 40 分間煮沸した。煮沸途中の 20 分と 40 分のものについて毒力を測定し、煮沸前と比較した。

2) 重曹の添加：約 10g のサイズに細切した毒力 220 MU/g の肝臓を用いて 3 分間手揉み後、肝臓(毒力 110 MU/g)を 2 つの鍋に別け、肝臓調理法に従ってそれぞれ 17 分間煮沸した。片方の鍋には重曹(炭酸水素ナトリウム)を 3g 添加し、もう片方の鍋には添加せずに、それぞれ更に 3 分間煮沸した。両方の鍋から一部の肝臓を取り出し、肝臓の表面を精製水でよく洗浄した後、毒性試験に供して両者の毒力を比較した。両者の残りの肝臓は再度 17 分間煮沸した後、炭酸水素ナトリウム 3g 添加、無添加の加熱操作を再度行って同様に処理し、両者の毒力を比較した。

結果及び考察

1. 細切サイズ別の除毒の相違

毒力 390 MU/g の有毒肝臓から調製した 3 サイズの切片を用いて、細切サイズの影響を調べた結果を Table III-2 に示した。切片の 3 サイズ別の手揉み後の残存毒力は、肝臓調理法の通常サイズ(12.0 ± 2.3)が 270 MU/g(残存率 69.2%)に対して 4 分の 1 分割サイズ(3.4 ± 1.0)が 190 MU/g(同 48.7%)、4 倍サイズ(39.2 ± 2.1)が 320 MU/g(同 82.1%)で、煮沸後の残存毒力はそれぞれ 20 分後が 190 MU/g(残存率 48.7%)に対し 120 MU/g (同 30.8%)、230 MU/g(同 59.0%)で、40 分後が 110 MU/g(同 28.2%)に対し 79 MU/g (同 20.3%)、130 MU/g(同 33.3%)であった。手揉み後及び煮沸後ともに、切片のサイズが小さいほど残存する毒力は低かった。

Table III-3 には、3 サイズに細切した有毒肝臓を手揉みせずに直接煮沸した結果を示した。毒力 83 MU/g の肝臓から調製した 28 ± 3.1 g の切片、そ

の4分の1分割切片(6.5 ± 1.5 g)及び16分の1分割切片(1.4 ± 0.6 g)を20分間煮沸した後の毒力は、それぞれ120 MU/g(残存率66.7%)、110 MU/g(同61.1%)、75 MU/g(同41.7%)で、40分間煮沸後の毒力はそれぞれ74 MU/g(残存率41.1%)、63 MU/g(同35.0%)、45 MU/g(同25.0%)で、手揉み工程を省略して煮沸した場合も残存毒力は細切サイズが小さくなるに従って低くなった。

以上の結果は、細切のサイズが引き続く手揉み工程と煮沸工程での除毒に影響することを示している。伝統的調理法では10～15gに細切しているが、細切サイズをこれより小さくすることで除毒率は更に高められると考えられた。

Table III-2. Influence on remaining toxin of "Trafugu" liver pieces during cooking processes dependent upon their size

Cooking process	Size of liver pieces (g)					
	39.2 ± 2.1		12.0 ± 2.3		3.4 ± 1.0	
	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)
Untreated	390	100	390	100	390	100
Pressing and washing	320	82.1	270	69.2	190	48.7
Boiling for 20min	230	59.0	190	48.7	120	30.8
40 min	130	33.3	110	28.2	79	20.3

Table III-3. Influence on remaining toxin of "Trafugu" liver pieces during "boiling" process without "pressing and washing" dependent upon their size

Cooking process	Size of liver pieces (g)					
	28.3 ± 3.1		6.5 ± 1.5		1.4 ± 0.6	
	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)
Untreated	180	100	180	100	180	100
Boiling for 20min	120	66.7	110	61.1	75	41.7
40 min	74	41.1	63	35.0	45	25.0

2. 手揉みによる除毒の相違

2. 1 手揉み工程の有効性

Table III-2 及び Table III-3 の毒力の残存率を比較した結果、手揉み工程の有効性が示された。すなわち、Table III-2 に示した 3 分間手揉み後の毒力の残存率は、手揉みを省略した煮沸 20 分後の毒力の残存率 (Table III-3) に各細切サイズともほぼ匹敵していた。わずか 3 分間に過ぎない手揉みの除毒効果は顕著で、伝統的調理法においてはこの工程が不可欠なものであると考えられた。

2. 2 手揉みの熟練度

伝統的調理法では、手揉みが特に熟練を要する調理工程と考えられる。そこで毒力 220 MU/g の有毒肝臓を用いて、専門調理師と素人とがそれぞれ 3 分間手揉みし、その毒力を比較したところ、専門調理師による手揉みが 110 ± 24 MU/g (残存率 $50 \pm 11\%$ 、 $n=3$)、素人による手揉みが 98 ± 10 MU/g (同 $45 \pm 5\%$ 、 $n=3$) であった (図示せず)。専門調理師の手順を真似た素人の手揉みでも、除毒の効果には明白な差が認められなかった。

2. 3 手揉み時間

Fig. III-10 には、毒力 220、310、350 MU/g の有毒肝臓 3 個体をそれぞれ 3 分、6 分、9 分間手揉みした結果を示した。手揉み時間が長くなるにつれて残存毒力の割合は $68 \pm 7.4\%$ 、 $59 \pm 13\%$ 、 $57 \pm 7.6\%$ と徐々に小さくなったが、最初の 3 分間の減毒と比べて 6 分以降の減毒は僅かであった。このことから、手揉み時間は長いほど有効ではあるものの、現行の 3~5 分間ではほぼ十分と考えられた。

3. 煮沸

3. 1 煮沸水量

Table III-4 には、毒力 220 MU/g の肝臓切片を肝臓重量の 5 倍量、10 倍量及び 100 倍量の水で煮沸した結果を示した。肝臓中の毒の残存率は、煮沸 20 分後がいずれも 50.0% で、煮沸 40 分後がそれぞれ 28.6%、31.8%、32.7%

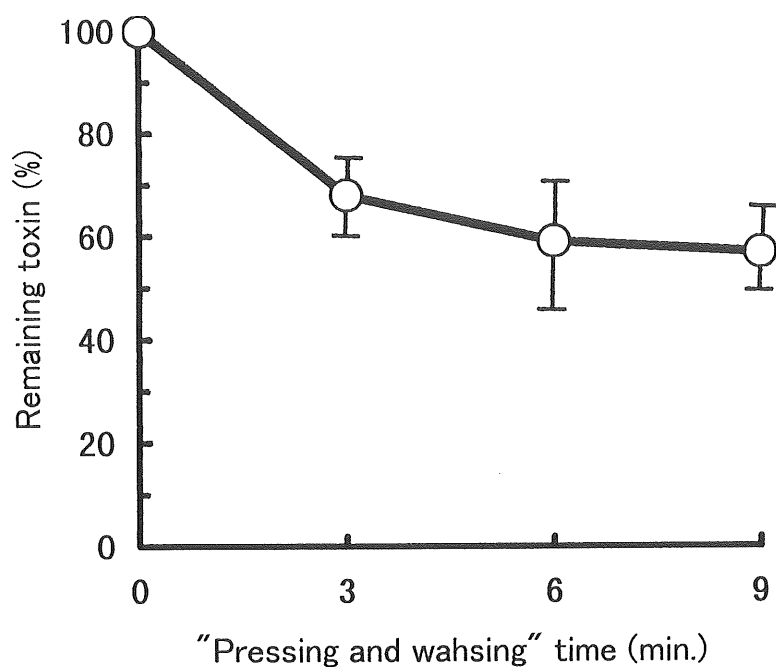


Fig. III-10. Decomposition of "Torafugu" liver toxin during "pressing and washing" precedure.

Table III-4. Influence of water volume on remaining toxin of "Trafugu" liver pieces during "boiling" process without "pressing and washing"

Boiling time (min)	Volume for "boiling" process					
	5-fold		10-fold		100-fold	
	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)	Toxicity (MU/g)	Remaining toxin (%)
0	220	100	220	100	220	100
20	110	50.0	110	50.0	110	50.0
40	63	28.6	70	31.8	72	32.7

であった。煮沸 40 分後では、煮沸水量が多くなるに従って肝臓中の毒の残存率が大きくなる傾向がみられたが、その差は顕著でなかった。伝統的調理法では肝臓をその約 10 倍容量の水で煮沸し、除毒している。煮沸水量を減らすにしても限界があり、Table III-4 の結果から煮沸水量の増減で除毒を高めることは困難と考えられた。

3. 2 重曹の添加

肝臓調理法では、1 回目と最後(5 回目)の煮沸工程の終了直前に少量(約 3g)の重曹(炭酸水素ナトリウム)が添加されている。これは、アルカリにより TTX の分解(福田, 1936; 末兼と八木, 1970)が促進されることを期待した添加と思われる。

手揉み後の毒力 110 MU/g の肝臓を 17 分間煮沸した後、煮沸水に炭酸水素ナトリウムを 3g 添加したものと無添加のものに別けてそれぞれ更に 3 分間煮沸して結果を比較したが、添加処理の肝臓毒力は 52 MU/g で、無添加では 55 MU/g を示した。前者の肝臓を再度 17 分間煮沸した後、上記と同様に添加処理または無添加の両者を比較した結果は、添加処理の肝臓毒力が 34 MU/g で、無添加が 35 MU/g を示した(表示せず)。いずれも炭酸水素ナトリウム添加による減毒の効果は認められず、添加した炭酸水素ナトリウムは肝臓中には浸透しないと考えられた。また、このときの煮沸水の pH は 9 前後を示した。

3. 3 熱効率

上記 2. 1 の項で検討したサイズ別の煮沸試料(Table III-3)における HPLC 分析結果を、Fig. III-11 に示した。TTX、anh-TTX 及び TDA の成分組成は、細切した切片のサイズにより異なっていた。無毒とされる TDA の組成比は 16 分の 1 分割切片で最も大きく、逆に TTX の組成比は最も小さかった。肝臓切片が小さいほど TTX→TDA 変換が急速に進行して、同じ煮沸条件下であっても減毒率が高くなったと考えられる。

この結果から、煮沸工程の除毒効果を高めるには、前節で示した 100℃を超える高温加熱の方法と熱効率を高める方法とがあることが分かった。

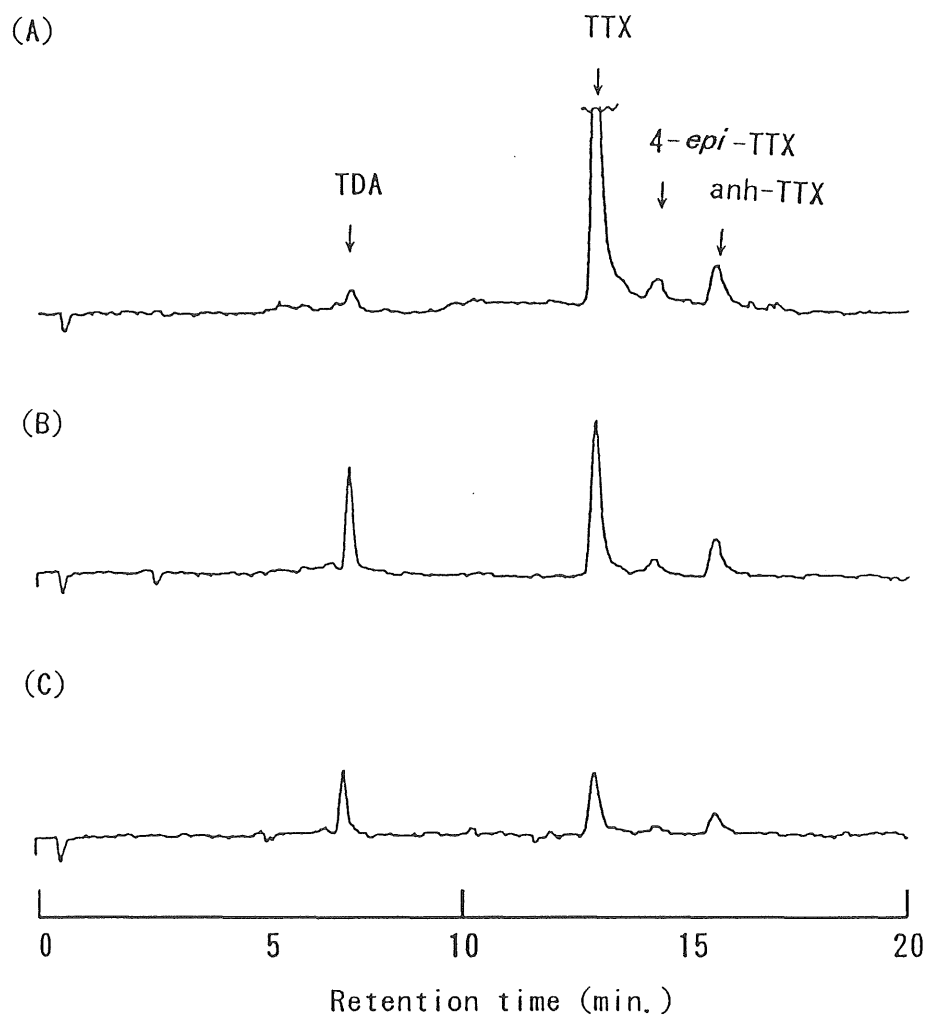


Fig. III-11. HPLC pattern of "Torafugu" liver toxin after "boiling" process in different liver sizes.

(A), Untreated; (B), 28.3 ± 3.1 g; (C), 1.4 ± 0.6 g.

4. 除毒限界の推定

以上の結果並びに前節までの研究から、大分地方のフグ肝臓調理法では、細切、手揉み、煮沸の3調理工程は不可欠なものであることが分かった。また、手揉みは3分間で十分なものの、細切はできるだけ小さく、加熱は100℃を超える高温で行うと、より高い除毒効果が得られた。

伝統的調理法ではフグ毒の組織からの溶出と煮沸分解とにより毒が除去されると考えられるが、このうち組織からの毒溶出は手揉み工程で最も顕著である。第2章で示したトラフグの調理14例では、手揉み後の残存毒力は平均 $70 \pm 18\%$ (S.D.) と算定された。また、煮沸工程は有毒肝臓中でのフグ毒の分解が主な除毒機構と考えられるが、1回目の煮沸時には毒溶出も関与しており、調理14例の1回目煮沸後の残存毒力は平均 $39 \pm 8.1\%$ (S.D.) であった。これに肝臓重量比を乗じて算出した除毒率は平均 $87.8 \pm 4.7\%$ (S.D.) で、1回目の煮沸後までに毒量としては約90%が除去されると推定された。一方、2回目以降の煮沸工程では煮沸時間に依存して、ほとんど一次反応的に減毒が進行する。

このことから、肝臓調理法の煮沸時間を推定することが可能で、仮に1,000 MU/gの有毒肝臓を厚生省の無毒基準値10 MU/g未満に除毒するケースを想定すると、1回目の煮沸後の残存毒力が約40%であるから、400 MU/gの肝臓毒力が40分の1未満に減毒する2回目以降の煮沸時間を算出すればよい。前節のFig. III-8の結果から約175分と算定され、肝臓調理法では1回目の煮沸時間20分と合算した約195分間の煮沸で1,000 MU/gの有毒肝臓が無毒化されると推定された。反対に、これより短い時間の煮沸では、肝臓中に10 MU/g以上の毒力が残存する。他方、本節で検討した細切サイズをより小さくすることで、煮沸時間は更に短縮が可能である。更に120℃オートクレーブ加熱を適用すれば、手揉み工程を省略しても肝臓調理法より迅速な無毒化が可能で、Fig. III-8の結果からは無毒化に要する加熱時間が約155分と算定された。

厚生省通知で許可されている卵巣と皮の加工品は、長期間塩蔵処理して

除毒する方法であるのに対して、肝臓の伝統的調理法は調理工程を工夫し、除毒を短時間で行うものである。それだけに除毒は確実に行う必要があり、本研究で検討した 120℃のオートクレーブ処理に例示されるような除毒を正確に管理できる調理方法でなければ、「キモ料理」の安全な提供は困難と思われる。

第4節 要 約

1. 有毒肝臓中のフグ毒の分布を調べた結果、下端部を除く他の部位の毒は、ほぼ均一に分布すると考えられた。低毒性を示した下端部の重量比は、この現象が特に著しい肝臓重量の大きいものでも10%程度と推察された。有毒肝臓を用いる除毒効果の検討には下端部を除く必要があり、現行のフグ毒検査法で試料を採取する場合にもこの点を留意する必要があると思われた。

2. フグ毒の加熱による影響を調べ、次の知見を得た。

1) トラフグの有毒肝臓抽出液を中性または pH 4 の酸性下で 30 分間直火または水浴で加熱したときの減毒率は、中性液が直火加熱で 68.2%、水浴加熱で 43.2% に対し、酸性液が直火加熱で 25.8%、水浴加熱で 17.4% であった。水溶液中のフグ毒は、加熱時の液性と温度によっては従来いわれているほど熱に安定でないことが分かった。

2) 中性の TTX 標品水溶液をオートクレーブで 120℃加熱すると、有毒肝臓の中性抽出液を直火加熱したときよりも著しい減毒がみられた。中性下での減毒は、 $TTX \rightarrow anh-TTX \rightarrow TDA$ 変換に基づくことが HPLC クロマトグラム上で示された。他方、pH 4 の酸性下加熱では、 $TTX \rightarrow anh-TTX$ 変換の進行が遅く、引き続く $anh-TTX \rightarrow TDA$ 変換がほとんどみられないため、緩やかに減毒することが分かった。

3) トラフグの有毒肝臓を用いて、オートクレーブによる 120℃加熱とフグ肝臓調理法の煮沸加熱とを比較した結果、除毒効果は 120℃加熱の方が高かった。

4) フグ肝臓調理法の煮沸工程では加熱時間と毒力との間に関係式が成立することから、減毒推定式を算定した。肝臓調理法においては、煮沸前の肝臓毒力を知ることにより、毒性消失までの煮沸時間を推定することも可能と考えられた。

3. 大分地方のフグ肝臓調理法について調理工程ごとの除毒効果を検討した結果、除毒には細切・手揉み・煮沸の3工程はいずれも不可欠で、手揉み時間は3分間で十分なものの、細切はできるだけ小さくし、加熱は100℃を超える高温で行うと高い除毒効果が得られることが分かった。1,000 MU/gの有毒肝臓は、肝臓調理法では手揉みによる毒溶出除去を考慮すると195分以上の煮沸で、120℃では手揉みなしの155分以上の加熱により、それぞれ無毒化(10 MU/g未満)すると推定された。

第4章 簡易フグ毒検査法の確立と汎用化

本章では、簡便な TTX 定量法の確立とその汎用化について検討した。現在、フグ毒の検査には操作が比較的簡単なことから、マウス毒性試験法(厚生省, 1991)が公定法とされている。しかし、マウス管理の煩雑さや生物学的判定に伴う精度及び感度の問題、TTX と他のマリントキシンを区別できないなどの理由から、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる化学的定量法の開発も行われてきた(YASUMOTO, *et al.*, 1982; ONOUE, *et al.*, 1983; NAGASHIMA, *et al.*, 1987)。しかし、これらの方法は一般に多量の試料と、かなり複雑な精製操作を必要とし、サンプル量の少ない部位別の検査やルーチン業務には適用が難しいケースがあるなどの問題点が残されている。また、最近になって免疫学的測定法が検討されているが、未だ汎用性に乏しく、定量法として確立していない(MATSUMURA, 1995; KAWATSU, *et al.*, 1997)。

これらの点に留意して、試料の前処理方法を簡便にし、HPLC 法の測定感度を更に向上させる改良を行った。これにより、魚貝類中のフグ毒を簡便に精度よく定量する HPLC 検査法を確立し、汎用化できると考えた。

第1節ではフグ毒の蛍光体化条件について検討し、測定感度の向上を図った。また、簡便かつ迅速に試料検液を調製する目的で、カートリッジカラムを用いるクリーンアップと濃縮方法を検討した。

第2節では、第1節で得られたデータを基にフグ及び巻貝を試料とした検討を行い、魚貝類中のフグ毒を簡便に精度よく定量する HPLC 検査法を確立した。

第3節では、上記で確立したフグ毒検査法の実施例を示した。食中毒死亡者の吐物とその原因フグの分析例、フグ肝臓中の部位別の毒組成分析例である。

第1節 HPLC法における簡易化の検討

フグ毒の化学的定量法には、HPLC-蛍光検出法、GC-MS法、マスペクトリー法などが知られているが、最も使用例の多いのがHPLC-蛍光検出法である。この方法には、フグ毒を弱酸性陽イオン交換カラムでTTXとその関連物質に分離して蛍光化試薬で蛍光体化するものと、カウンターイオンを用いたODSカラムでフグ毒を分離後、強アルカリで加熱して蛍光体化するものがあり、最近では後者の方法がよく検討されている(YASUMOTO, *et al.*, 1982, 1985; ONOUE, *et al.*, 1983; NAGASHIMA, *et al.*, 1987)。しかし、HPLC-蛍光検出法には、検出感度や試料調製上の問題などが未だ残されている。本節ではこれらの点について検討した。

試料及び方法

1. 試薬

- 1) メタノール：和光純薬工業製、HPLC用
- 2) n-ヘキサン、ジクロロメタン：和光純薬工業製、残留農薬分析用
- 3) リン酸一カリウム、リン酸ニカリウム、水酸化ナトリウム：和光純薬工業製、特級
- 4) 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム：Kodak社製、HPLC用
- 5) TTX標準溶液：シグマ社製TTX標品1mgを10mlの精製水に溶かし、標準原液とした。この標準原液を必要に応じて、HPLCの移動相溶液で希釈して用いた。
- 6) Anh-TTX溶液：マフグ肝臓からNARITAら(1981)の方法に準じて精製したものをanh-TTXとした。これをHPLCの移動相溶液に溶解して用いた。
- 7) TDA溶液：津田(1967)の報告に従って、TTX標品の水溶液を100℃で8時間以上加熱しTDAを生成させた。これをHPLCの移動相溶液で希釈して用

いた。

2. 装置及び器具

- 1) 高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製、TRI ROTAR SR 型
- 2) 蛍光検出器：日本分光工業製、FP-110-D 型
- 3) アルカリ送液ポンプ：島津製作所製、LC-5A 型
- 4) 反応恒温槽：島津製作所製、GC-3B 型の恒温水槽
- 5) 遠心分離器：日立製作所製、05PR-22 型
- 6) SEP-PAK C_{18} カートリッジカラム：Waters 社製
- 7) BAKER 10-SPETM スルホン酸型カートリッジカラム：Baker 社製

3. 分析操作

3. 1 HPLC 測定条件

- 1) カラム：YMC AM-314・ODS (6.0 I.D. × 300 mm)
- 2) 移動相：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを 2 mM 含む 0.05M リン酸塩緩衝液／メタノール (99 : 1)

- 3) カラム温度：40℃
- 4) 流速：0.8 ml/min.
- 5) 試料注入量：50 μ l
- 6) 蛍光検出器：励起波長 400 nm、蛍光波長 495 nm

3. 2 蛍光体化条件

- 1) 反応液：4N 水酸化ナトリウム溶液
- 2) 流速：0.8 ml/min.
- 3) 反応温度：130℃
- 4) 反応コイル：ステンレス管、0.25 mm I.D. × 15 m

3. 3 検量線の作製

TTX 標準原液を HPLC の移動相溶液で希釈して、4、8、12、16、20 μ g/ml の標準列を作製し、その 50 μ l を HPLC に注入した。定量はピーク面積による絶対検量線法で行った。なお、標準溶液は、分析時は氷水中に保ち、保存は -20℃ 以下に冷凍した。

結果及び考察

1. HPLC分析システムの検討

TTX はアルカリの存在下で加熱すると、“C₉-base” (2-amino-6-hydroxy-methyl-8-hydroxyquinazoline) に変換し、蛍光体化されるので蛍光強度によって定量できるとされている(津田, 1967; YASUMOTO, *et al.*, 1982)。そこで、HPLC イオン対法と蛍光体化反応を組合せた分析システムについて検討した。

1. 1 HPLC測定条件について

NAGASHIMA ら(1987)の方法に準じて HPLC 測定条件を検討したところ、実験方法の 3. 1 の項に示した条件で TTX は単一のピークとして得られ、保持時間及びピーク面積の再現性も良好であった。この HPLC 条件で測定波長と蛍光強度の関係を調べた結果を Fig. IV-1 に示す。この結果から励起波長 400 nm、蛍光波長 495 nm にて測定することとした。

1. 2 蛍光体化条件について

TTX の蛍光体化には、アルカリ濃度、加熱温度、反応時間の 3 者が関係すると考えられている。TTX を試験管内で蛍光体化させたときの 3 者の最適条件は既に報告(NUNEZ, *et al.*, 1976)されているが、本研究で採用しているような post-column derivatization 方式での蛍光体化条件については詳細な報告がなく、また加熱温度を 100℃以上にしたときの蛍光体化については全く検討されていない。そこで、反応液には 3N 及び 4N の水酸化ナトリウム溶液を用い、空気恒温槽で 100~170℃の範囲で加熱し、また反応時間については恒温槽内に入れた反応コイル(HPLC 用ステンレス管、0.25 mm I.D.)の長さを 10~15 m に調整することで、本方式における最適蛍光体化条件を求め、Fig. IV-2 に示す結果を得た。

本結果から、実験方法の 3. 2 の項に示した条件で蛍光体化を行った。

なお、反応後の試料は高温となるため、氷冷を用いて冷却した後、検出器に導入するようにした。これらの検討による改善で、従来のものより約 10

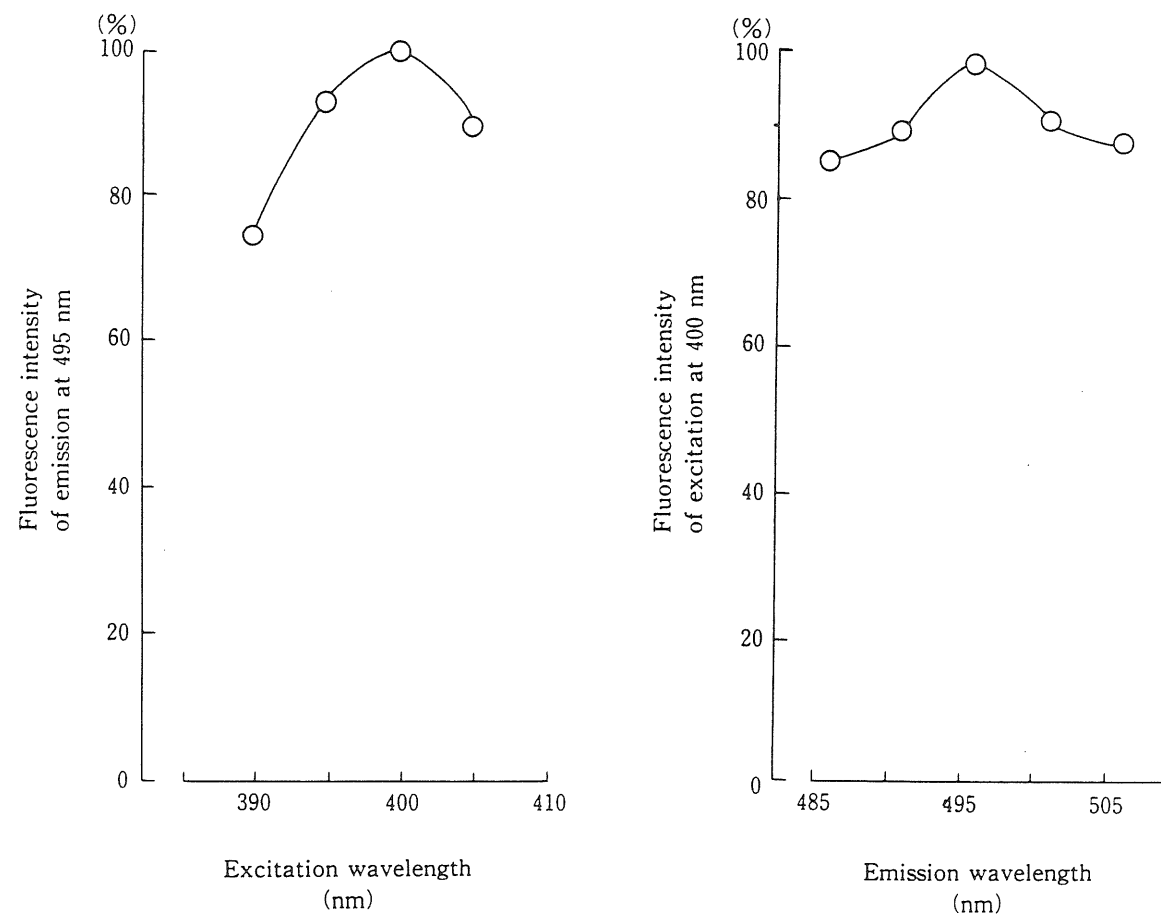


Fig. IV—1. Fluorescence intensity obtained at different detector wavelengths.

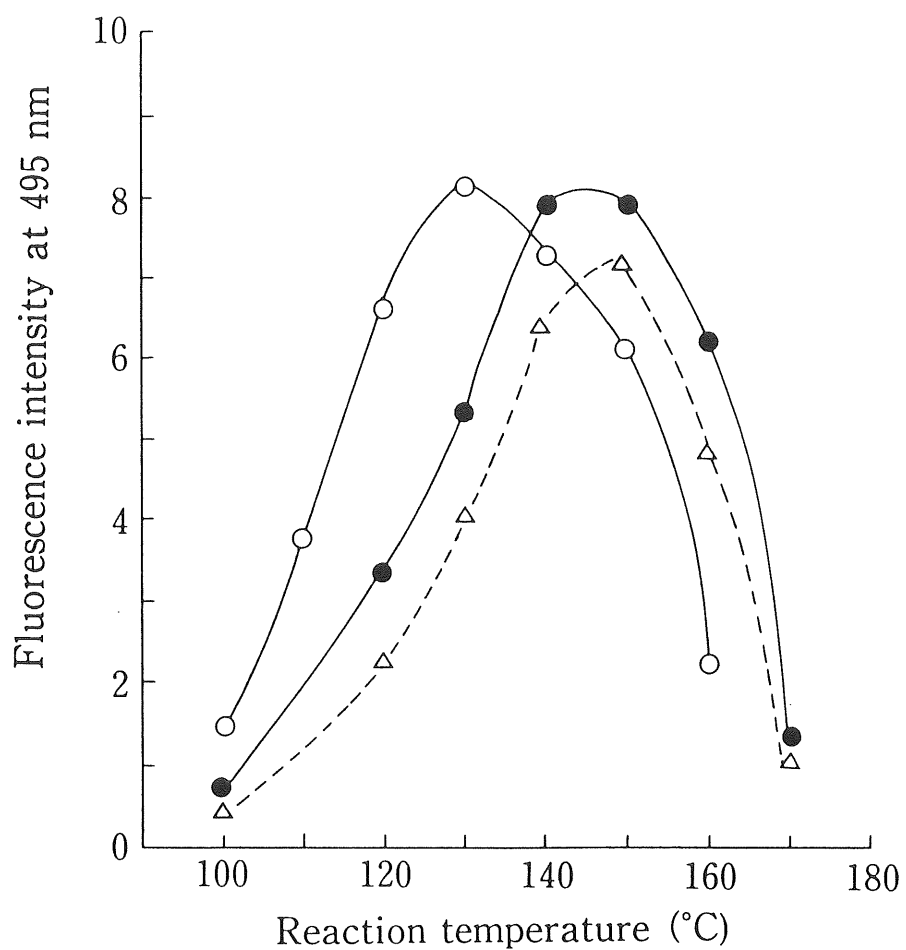


Fig. IV-2. Effect of reaction temperature on fluorescence intensity.

○—○, with 4N NaOH in a reaction coil, 15 m×0.25 mm I.D.
 ●—●, with 4N NaOH in a reaction coil, 10 m×0.25 mm I.D.
 △···△, with 3N NaOH in a reaction coil, 10 m×0.25 mm I.D.

倍の蛍光強度が得られた。

1. 3 検量線について

以上の HPLC 測定条件と蛍光体化条件に従って作成した検量線を Fig. IV-3 に示す。検量線は TTX の $0.05\ \mu\text{g}$ から $2\ \mu\text{g}$ の範囲で良好な直線性が得られ、最小検出量は約 $8\ \text{ng}$ であった。NUNEZ ら (1976) の検出下限と比較して、約 13 倍検出感度を向上させることができた。

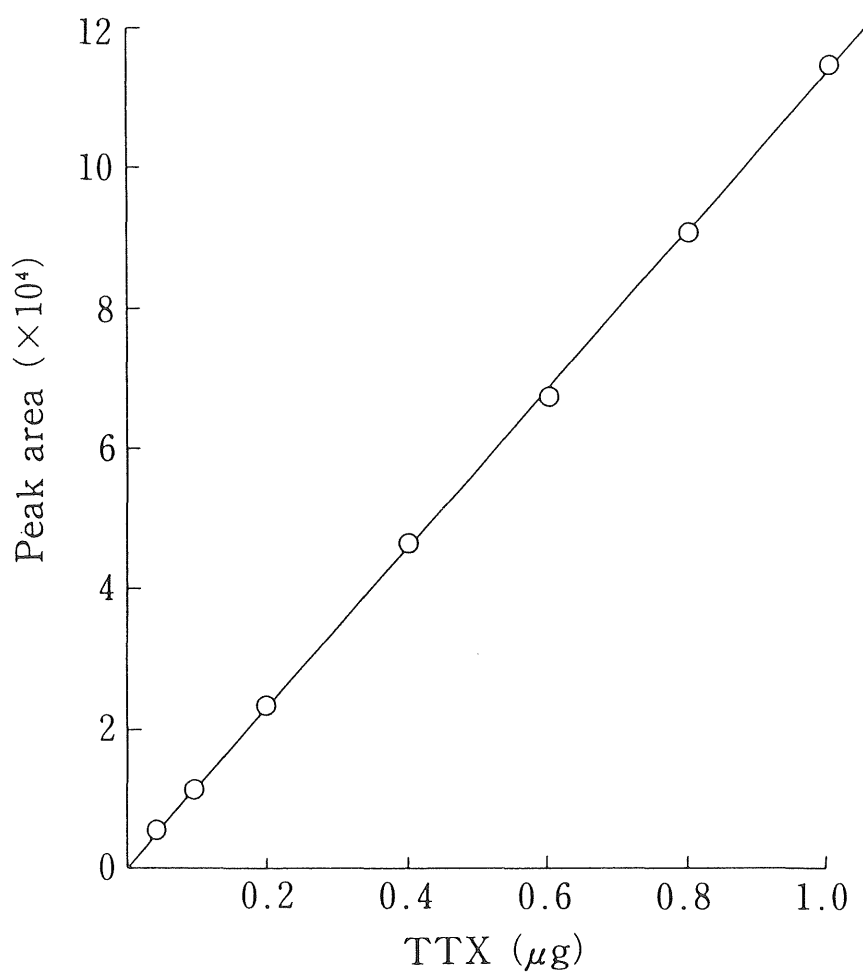


Fig. IV-3. Calibration curve for authentic TTX.

2. 試験溶液調製法の検討

マウス毒性試験の0.1%酢酸抽出法(厚生省, 1991)は操作が簡便であること、また公定法のマウス毒性試験測定値との比較ができる点などを考慮して、0.1%酢酸抽出液をそのまま用いる HPLC の試験溶液調製法を検討した。0.1%酢酸抽出液は多くの夾雑物を含むため、良好なクロマトグラム及び再現性を得るためにはクリーンアップ操作が必要である。そこで、簡便かつ迅速な前処理を行う目的でカートリッジカラムを用いたクリーンアップ操作について検討した。

2. 1 SEP-PAK C₁₈ カラムによるクリーンアップ効果

最初、TTX を SEP-PAK C₁₈ カラムに保持させたのち溶出させる条件を検討したが、本カラムは TTX をほとんど保持しなかった。そこで、逆に夾雑物をカラムに吸着させ、TTX を素通りさせる方式によることとした。

TTX 標品 50 μ g を含む 0.1%酢酸を負荷して、カラムから TTX が全量素通り溶出されるのに必要な 0.1%酢酸の液量を調べた。その結果、負荷した液量に関係なく、カラムを 0.1%酢酸 2 ml で洗浄すると TTX は全量溶出した。そこで、念のため 0.1%酢酸 3 ml で、負荷後のカラムを洗浄した。

ジクロロメタン脱脂後の実試料を用い、SEP-PAK C₁₈ カラムから溶出させた試験溶液を HPLC 分析システムに注入したところ、まだ多数のピークが認められ、さらにクリーンアップが必要と判断された。

2. 2 BAKER 10-SPETM スルホン酸型カラムによるクリーンアップ及び濃縮効果

SEP-PAK C₁₈ カラム溶出液を 0.1%酢酸で平衡化したカチオン交換カートリッジカラムの BAKER 10-SPETM スルホン酸型カラムに負荷したところ、TTX はカラムに保持された。そこで、夾雑物を除去する目的でカラムの洗浄方法につき検討した。精製水及びメタノール各 5 ml で洗浄したところ、TTX はカラムに保持されたままであった。従って、実試料ではカラム負荷後、0.1%酢酸 5 ml で洗い込みと洗浄を行い、さらにメタノール 2 ml と精製水 4 ml でカラムを洗浄した。

TTX の溶出にはカラムの液性を中性にする必要があることから、溶出液には HPLC の移動相と同じリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) / メタノール (99 : 1) を用いることとし、0.05~0.5M の同溶出液につき検討を行った。0.05M では溶出に要する液量が 5 ml を超え、他方、0.4M 以上では溶出液量が 2~3 ml と少量で済むものの、これを HPLC に連続注入したところ、ピーク波形に若干の変化が認められ、HPLC カラムに与える影響が懸念された。0.1~0.3M では溶出液量が 3~4 ml と大差なく、また連続分析でもピーク波形等に与える影響が全く認められなかったので、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを 2 mM 含む 0.1M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) / メタノール (99 : 1) を用いて TTX の溶出を行った。TTX 標品 50 μ g を本カラムに負荷し、上記の溶出液で溶出させたときの TTX 溶出曲線を Fig. IV-4 に示す。1.5 ml 付近から溶出が始まり、4.5 ml までに TTX は全量溶出した。

関連して、上述の溶出条件下における TTX 関連物質の anh-TTX 及び TDA の挙動についても検討を加えた。その結果、溶出は TDA、TTX、anh-TTX の順で起こることが認められた。TDA は 0.5 ml から溶出が始まり、4.0 ml までに全量溶出した。anh-TTX は 1.5~5.0 ml までに全量溶出した。また、TTX やその関連物質の通常の HPLC パターンを考慮すると、4-*epi*-TTX も TTX や anh-TTX と相似た傾向で本カラムから溶出するものと推測された。

以上の結果から、TTX や関連物質の組成をみるためには、本カラムからの溶出液の分取量は 6 ml とするのが適当と考えられた。このときの本カラムによる濃縮効果は、0.1% 酢酸抽出液を 50 ml の全量 (試料 10 g に相当) 用いると約 8.4 倍になった。

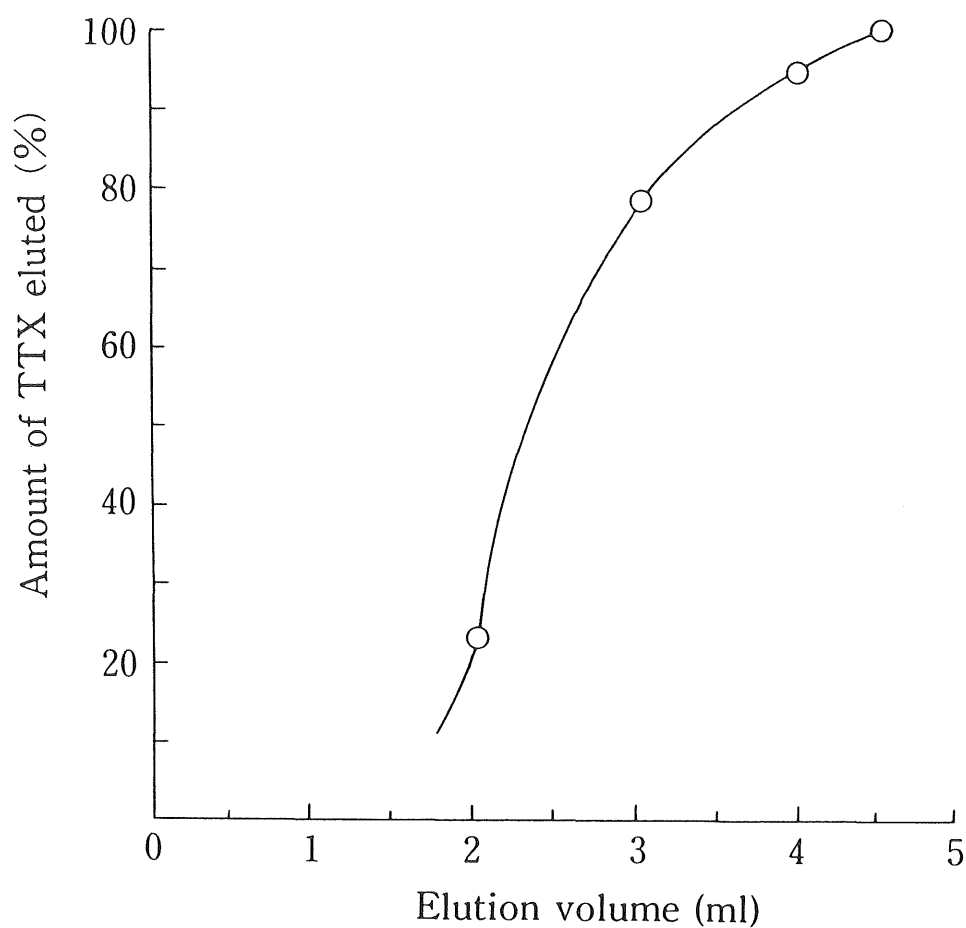


Fig. IV—4. Elution of TTX from the Baker 10-SPE cation-exchange column (0.9×5 cm. SO_3H form, cartridge), with 0.1M phosphate buffer (pH7.0) containing 2mM heptanesulfonic acid and methanol at 99:1(v/v).

第2節 簡易フグ毒検査法の確立

前節では、蛍光スペクトルやアルカリ濃度、反応温度、反応コイルなどのフグ毒の蛍光化条件について検討し、検出感度を約10倍向上させることができた。また、2種類のカートリッジカラムを用いる試料調製法を検討し、TTX及びその関連物質を約8倍に濃縮する簡便な方法を開発した。本節では、これらの結果を基にフグ及び巻貝を試料とした検討を行って、魚貝類中のフグ毒を簡便に精度よく定量するHPLC検査法を確立した。

試料及び方法

1. 試料

試料として、トラフグ *Takifugu rubripes* の肝臓と卵巣、コモンフグ *Takifugu poecilonotus* の筋肉と皮、巻貝ボウシュウボラ *Charonia sauliae* 及びテングニシ *Pugilina (Hemifusus) ternatana* の各中腸腺を用いた。

2. 試薬

- 1) メタノール：和光純薬工業製、HPLC 用
- 2) n-ヘキサン、ジクロロメタン：和光純薬工業製、残留農薬分析用
- 3) リン酸一カリウム、リン酸ニカリウム、水酸化ナトリウム：和光純薬工業製、特級
- 4) 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム：Kodak 社製、HPLC 用
- 5) TTX 標準溶液：シグマ社製 TTX 標品 1 mg を 10 ml の精製水に溶かし、標準原液とした。この標準原液を必要に応じて、HPLC の移動相溶液で希釈して用いた。
- 6) Anh-TTX 溶液：マフグ肝臓から NARITA ら(1981)の方法に準じて精製したものを anh-TTX とした。これを HPLC の移動相溶液に溶解して用いた。
- 7) TDA 溶液：津田(1967)の報告に従って、TTX 標品の水溶液を 100℃で 8

時間以上加熱し TDA を生成させた。これを HPLC の移動相溶液で希釈して用いた。

3. 装置及び器具

- 1) 高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製、TRI ROTAR SR 型
- 2) 蛍光検出器：日本分光工業製、FP-110-D 型
- 3) アルカリ送液ポンプ：島津製作所製、LC-5A 型
- 4) 反応恒温槽：島津製作所製、GC-3B 型の恒温水槽
- 5) 遠心分離器：日立製作所製、05PR-22 型
- 6) SEP-PAK C₁₈ カートリッジカラム：Waters 社製
- 7) BAKER 10-SPE™ スルホン酸型カートリッジカラム：Baker 社製

4. 分析操作

4. 1 試料抽出液の調製

「食品衛生検査指針Ⅱ」（厚生省，1978）のフグ毒検査法中の 0.1% 酢酸抽出法に従って調製した。すなわち、磨砕試料 10 g に 0.1% 酢酸 25 ml を加え沸騰水浴中で 10 分間加熱抽出した。冷後、これをろ過して、0.1% 酢酸で 50 ml の定容とした。この抽出液はマウス毒性試験にも使用した。なお、0.1% 酢酸抽出法では、試料 1g は抽出液 5 ml に相当する。

4. 2 試験溶液の調製

試料抽出液をフグの各試料では 30 ml 以上、巻貝試料では 15 ml 以上分取し、それぞれ同量のジクロロメタンを加えて脱脂した。さらに 1 回脱脂操作を繰り返した後、1,700×g で 10 分間遠心分離を行った。水層をフグの各試料では 25 ml、巻貝試料では 10 ml 分取し、あらかじめ 0.1% 酢酸で平衡化した SEP-PAK C₁₈ カートリッジカラムに通した。同カラムを 0.1% 酢酸 3 ml で洗い、全通過液 28 ml (フグ試料) または 13 ml (巻貝試料) を、あらかじめ 0.1% 酢酸で平衡化した BAKER 10-SPE™ スルホン酸型カートリッジカラムに負荷した。0.1% 酢酸 5 ml で洗い込みした後、BAKER カラムをメタノール 2 ml、次に精製水 4 ml で洗浄した。次いで、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを 2 mM 含む 0.1M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) / メタノール (99 : 1) 6 ml を用い、

TTX をカラムから溶出させ、HPLC 溶液とした。

4. 3 HPLC 測定条件

1) カラム : YMC AM-314 ・ ODS (6.0 I.D. × 300 mm)

巻貝試料の場合は、必要に応じて Li-Chrosorb RP₁₈₋₅ (4.6. I.D. × 50 mm) をガードカラムとして連結した。

2) 移動相 : 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを 2 mM 含む 0.05M リン酸塩緩衝液 / メタノール (99 : 1)

3) カラム温度 : 40℃

4) 流速 : 0.8 ml / min.

5) 試料注入量 : 50 μ l

6) 蛍光検出器 : 励起波長 400 nm、蛍光波長 495 nm

4. 4 蛍光体化条件

1) 反応液 : 4N 水酸化ナトリウム溶液

2) 流速 : 0.8 ml / min.

3) 反応温度 : 130℃

4) 反応コイル : ステンレス管、0.25 mm I.D. × 15 m

4. 5 検量線の作製

TTX 標準原液を HPLC の移動相溶液で希釈して、4、8、12、16、20 μ g/ml の標準列を作製し、その 50 μ l を HPLC に注入した。定量はピーク面積による絶対検量線法で行った。なお、標準溶液は、分析時は氷水中に保ち、保存は -20℃ 以下に冷凍した。

5. 5 マウス毒性試験法

「食品衛生検査指針 II」中のフグ毒検査法 (厚生省, 1978) に従って行った。

結果及び考察

1. フグ及び巻貝試料の HPLC クロマトグラム

実験方法の 4. 2 の項に従って調製した試験溶液を HPLC 分析システムに

注入したところ、トラフグの肝臓及び卵巣、コモnfグの皮及び筋肉のいずれを試料とした場合でもクロマトグラム上に妨害ピークは認められず、精度よく TTX の定量ができた (Fig. IV-5)。なお、コモnfグの皮及び筋肉では TTX が検出されなかったが、図中の (C) 及び (D) にはそれぞれ TTX 標品を添加したときのクロマトグラムを示してある。

巻貝ボウシュウボラ (有毒) 及びテングニシ (無毒) の中腸腺試料のクロマトグラムを Fig. IV-6 に示す。巻貝試料でも TTX を定量できるがクロマトグラム上にはまだ多数のピークが認められ、試験溶液もわずかながら着色していた。そこで、ボウシュウボラから得た試験溶液を HPLC に連続注入したところ、ピーク面積には影響しないものの、ピーク波形が徐々に変化する傾向が認められた。このため、巻貝では 0.1% 酢酸抽出液量を 10 ml (中腸腺として 2 g 相当量) に減らし、HPLC 分析カラムにはガードカラムを連結したところ、良好な定量分析が可能であった (Fig. IV-6)。この場合、ガードカラムを 30~40 試料ごとに交換することで、分析カラムへの影響は認められなかった。

2. 添加回収実験

マウス毒性試験及び本定量法で TTX を含有しないことが明らかなフグ及び巻貝の各試料抽出液に TTX 標品 $20\mu\text{g}$ あるいは $50\mu\text{g}$ を添加し、実験方法の 4. 2 の項に従って操作して回収率を求めた。結果を Table IV-1 に示す。3 回分析時の平均回収率はフグの各試料で 95.0% 以上、巻貝中腸腺で 80.4% とほぼ満足すべきものであった。なお、本法での検出限界はフグ試料では $0.2\mu\text{g/g}$ 、巻貝試料では $0.5\mu\text{g/g}$ であった。

3. マウス毒性試験値との比較

マウス毒性試験の毒性値は、TTX 以外の関連毒 (4-*epi*-TTX, anh-TTX など) をも含めた値と考えられるが、これら関連毒の比毒性は TTX より極めて低い (YASUMOTO, 1981)。このことから、本法の TTX 定量値とマウス毒性試験値と

は、相似た値を示すものと考えられた。そこで、本法とマウス毒性試験法との測定値の比較を行った。その結果は Table IV-2 に示すように、いずれの試料でも両法の測定値はよく一致し、相関係数は $r=0.99$ ($n=10$) と算定された。

以上の結果から、本法は TTX の日常試験法として充分実用に供し得ると考えられる。また、本法はマウス毒性試験用の抽出液の一部を用いて TTX の定量ができるうえ、TTX 関連物質の組成も同時に分析ができるという利点をもっている。

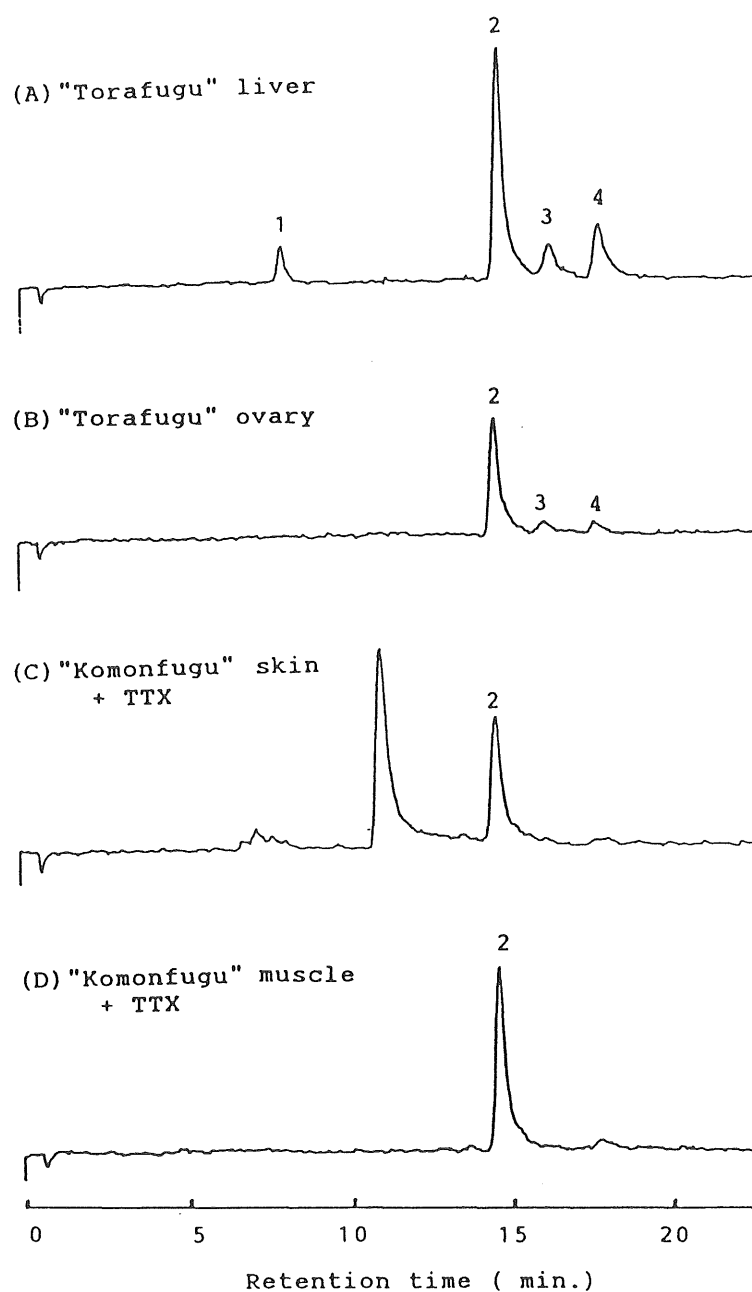


Fig. IV—5. High performance liquid chromatograms of extracts from various tissues of "Torafugu" and "Komonfugu".

Peak: 1, TDA; 2, TTX; 3, 4-*epi*-TTX; 4, anh-TTX.

In patterns C and D, authentic TTX was added to each extract and subjected to liquid chromatography.

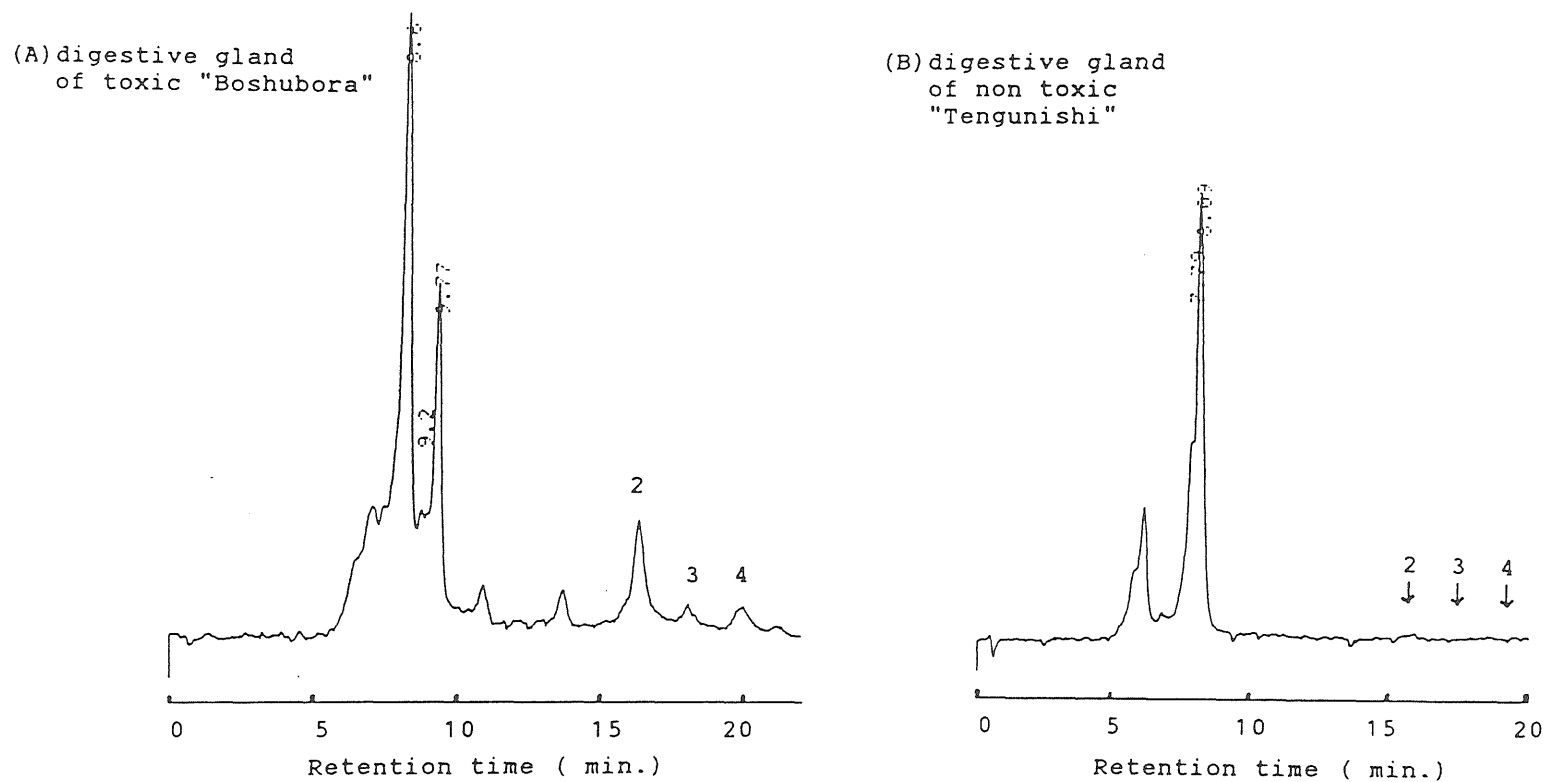


Fig. IV—6. High performance liquid chromatograms of extracts from the digestive gland of two gastropoda, "Boshubora" and "Tengunishi".

Peak: 2, TTX; 3, 4-*epi*-TTX; 4, anh-TTX.

Table IV-1. Recovery of authentic TTX added to puffer fish and trumpet shell extracts

Extract from :	Weight (g)	TTX added (μ g)	Recovery ^{*1} (%)	C.V. (%)
"Torafugu"				
liver	5	50	97.6 \pm 1.8	1.85
liver	5	20	96.2 \pm 2.2	2.64
ovary	5	20	95.7 \pm 2.6	2.73
"Komonfugu"				
muscle	5	50	98.0 \pm 3.2	3.31
muscle	5	20	95.0 \pm 3.1	3.26
skin	5	20	97.0 \pm 1.6	1.62
"Boshubora"				
digestive gland	2	50	80.4 \pm 4.1	4.36

*1 Average \pm S.D. (n=3).

Table IV-2. Comparison between toxicity scores determined by the HPLC and those by the mouse assay

Sample	Toxicity		
	HPLC method		Mouse assay method
	(μ g/g)	(MU/g) ^{*1}	(MU/g)
"Torafugu"			
liver	91.5	(416)	465
liver	74.4	(338)	349
liver	16.2	(74)	73
liver	< 0.2	(< 0.9)	< 5
ovary	43.8	(199)	216
ovary	13.6	(62)	64
"Komonfugu"			
muscle	< 0.2	(< 0.9)	< 5
skin	< 0.2	(< 0.9)	< 5
"Boshubora"			
digestive gland	40.9	(186)	226
digestive gland	< 0.5	(< 2.3)	< 5

^{*1} The amount(μ g) of TTX determined by HPLC was converted into MU, assuming that one MU was equivalent to 220 ng TTX.

第3節 汎用化例

本章で確立できた HPLC による TTX 簡易検査法の実施例として、本節では 2 例を記述する。1988 年に大分県で発生したヒガンフグの筋肉摂食による死亡事件での原因究明、及びトラフグ有毒肝臓中の部位別の毒成分組成分析である。このほか、本論文中的各章に示した HPLC 分析にも本章で確立した TTX 簡易検査法を適用した。特に、本節で例示した食中毒時の残品検査や肝臓中の部位別毒成分組成分析などサンプル量が制限されるケースでは、毒力と毒成分組成とを簡便に精度よく検査できる本法は有用性が高いと考えられた。

実施例 1．ヒガンフグ筋肉による食中毒事件の原因究明

1．事件の概要

1988 年 9 月 2 日 20 時ごろ、大分県東国東郡国見町内の A 夫婦が夕食としてフグ 1 匹とカレイ・タナゴなど合わせて計 5 ～ 6 匹の魚を煮付にして摂食した。同日 23 時ごろ、フグを食べた妻が口の痺れなどのフグ中毒特有の症状を訴え、翌 3 日 0 時町内 K 病院に入院加療したが、同日 0 時 23 分同病院で死亡した。K 病院は、同日 0 時 33 分変死事件として国東警察署に通報し、同署による検死の後、同日 8 時 35 分に国東保健所に食中毒事件の疑いで通報、届出をした。

患者の症状を時間経過に沿って記述すると、摂食 3 時間後に口の痺れ、嘔吐 2 回、手足の痺れ、胸部の痛みを訴え、摂食後約 4 時間で全身麻痺から意識不明、血圧低下、呼吸麻痺を呈した後、摂食後 4 時間 23 分頃に呼吸停止で死亡した。原因となったフグは、当日の朝、近くの海で夫が立て網にて漁獲した魚(約 10 匹)の中の 1 匹(体長約 20 cm)で、一旦冷蔵庫に保存後、当日の夜に他の魚と一緒に煮付調理したものである。フグは、内臓、

頭、皮を除去したいいわゆる「みがき」で、骨付きのまま煮付にしていた。当該フグは患者のみが食べており、患者は 58 歳、身長 150 cm、体重 70 kg、多少血圧が高かったものの、持病はなく健康であったが、前日と当日炎天下のなか農作業をしており、過労気味であった。

2. 検体の採取

国東警察署が捜査の際に押収した患者の吐物及びフグの頭部を検査検体とした。なお、夕食の残品はなく、フグの内臓・皮も発見できなかった。

3. フグの鑑別結果

フグの頭部の鑑別を大分生態水族館 高松史朗館長に依頼し、標準和名「ヒガンフグ」と確認した。

なお、夫は当該フグを「ナゴヤフグ」と呼んでおり、コモnfグ、ナシフグなど褐色模様のあるフグをすべて「ナゴヤフグ」と認識していた。

4. 患者吐物及び原因フグの検査結果

HPLC による TTX 簡易検査法及びマウス毒性試験法を用いたフグ毒の検査結果を Fig. IV-7 に示した。ヒガンフグ残品の頭部筋肉から 51 MU/g(弱毒)、患者吐物から 3.4 MU/g のフグ毒をそれぞれ検出した。また、残品の皮からは 110 MU/g(強毒)の毒性を検出した。簡易 HPLC 検査法では、患者吐物及び原因のヒガンフグ筋肉から、TTX とその関連物質を検出するとともに、吐物からは TTX の分解産物であると思われる未知成分のピークを検出した。これは、体内で TTX がすでに分解されつつあったことを示すと考えられる。

5. 原因物質及び原因食品

患者の症状及び吐物の検査結果から、本事件は TTX による食中毒と断定した。また、当該フグの頭部筋肉から 51 MU/g のフグ毒を検出したため、当該ヒガンフグを原因食品とした。患者が摂食したヒガンフグは、頭部の

大きさから全長 20cm、体重 200g 程度と推定され、当該フグの筋肉重量は 70～130g と思われた。従って、患者の摂取総毒量は、5,000 MU 程度と推定された。

本事件では、TTX 簡易検査法を適用することで迅速な原因究明が行われた。国東警察署から譲渡された患者の吐物は約 10g の少量であったが、毒力の測定と毒成分組成分析が同時にできる点で、HPLC を用いる TTX 簡易検査法は有用であった。

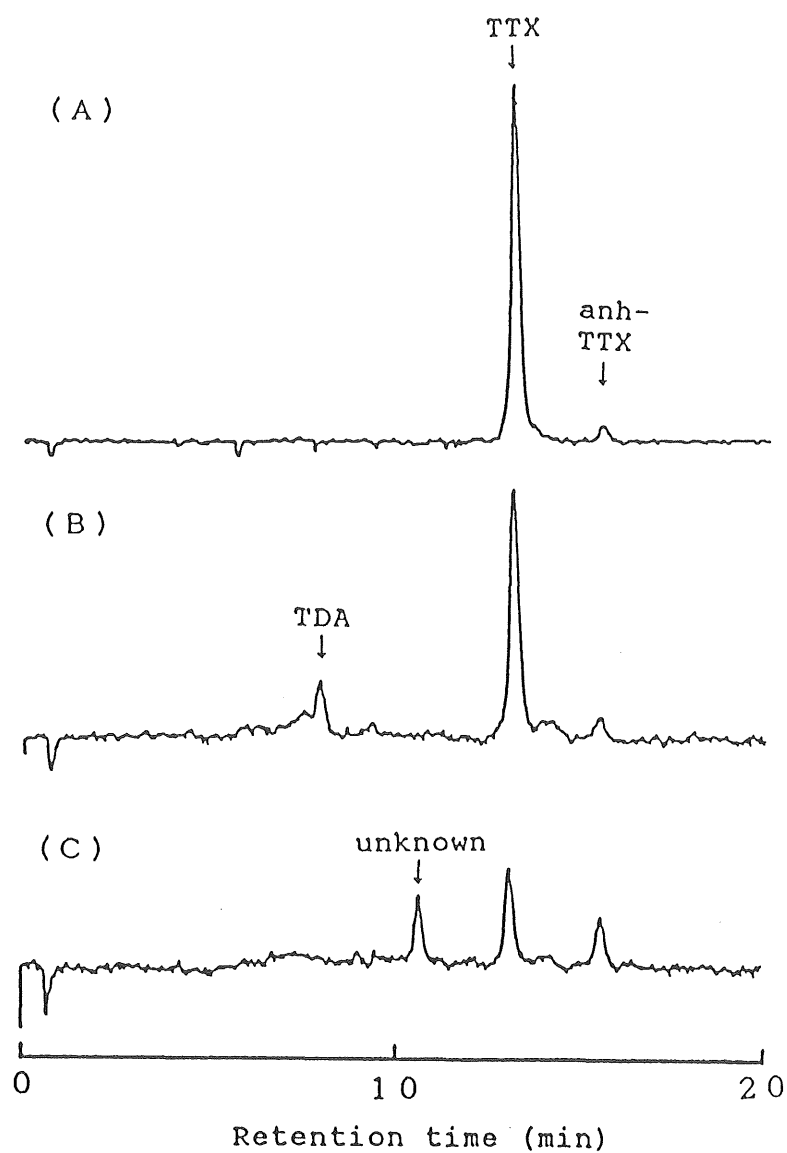


Fig. IV-7. High performance liquid chromatogram of toxins from muscle of a puffer fish "Higanfugu" and vomited matter of patient, and authentic TTX.

(A), authentic TTX; (B), "Higanfugu" muscle; (C), vomited matter.

実施例 2．フグ肝臓中の部位別の毒成分組成分析

第 3 章第 1 節では、フグの有毒肝臓における毒の分布を調べ、肝臓の下端部(尾側)に低毒性現象を認めて記述した。この現象はトラフグとカラスの比較的大きな肝臓でみられ、肝臓中の他の部位間ではほとんど毒性差がないにもかかわらず、肝臓重量 10%未満の下端部だけが他の部位より顕著な低毒性を示した。低毒性の原因は、下端部のフグ毒量が少ないためと推察されたが、近年、フグ毒には TTX 以外にも数種類の関連物質の存在が報告 (NAKAMURA and YASUMOTO, 1985; YASUMOTO, 1992) されている。下端部の毒成分組成を明らかにすることは、食中毒事件などの毒性検査時に役立つばかりでなく、フグの毒化機構を解明する上からも必要と考えられた。そこで、HPLC による TTX 簡易検査法を用いて、トラフグ肝臓の部位別の毒成分組成分析を行った。

1．試料

試料には、マウス毒性試験で、肝臓の下端部に低毒性現象が認められたトラフグの有毒肝臓 3 個体(420~600 g、雌)を用いた。また、トラフグの無毒肝臓 2 個体(500 g 及び 1,630 g、雌)を供試して、比較した。各肝臓の下端部、中央部及び上端部(消化管側)ごとに、各部位 1~2 切片を約 4~15 g ずつ採取し、HPLC を用いる TTX 簡易検査法及びマウス毒性試験法に供した。

2．結果及び考察

Fig. IV-8 には、トラフグの有毒肝臓を用いて、部位別の毒成分組成分析を行った結果を示す。図中の A~C 部位間で毒力差はほとんどみられなかったが、肝臓の下端部(D 及び E)は、これらの部位と比べて明らかに低毒性を示した。HPLC クロマトグラム上では、部位別の毒力変化に対応して、下端部側ほど TTX 濃度が低くなる傾向が認められた。また、TTX 関連物質のうち、有毒成分(NAKAMURA, 1985)とされる *anh*-TTX 及び *4-epi*-TTX も、TTX と

同様に下端部ほど低濃度であった。他方、無毒 (NAKAMURA, 1985) とされる TDA の濃度は、逆に下端部が最も高く、さらにクロマトグラムの挙動が TDA と似た未知成分のピーク (図中の unknown) も検出された。

今回分析した有毒肝臓のうちで、部位別の毒力差が 3 倍で最も小さかった肝臓を用いて、下端部 D と中央部 B との TDA 組成比を比較した結果を Fig. IV-9 に示した。下端部の試料を HPLC に 3 倍量注入し、両部位の毒量を同レベルとして TDA 濃度を比較したが、下端部の方が約 4 倍高濃度であった。このことから、部位別の毒力差が比較的小さい肝臓においても、TDA 組成比は下端部の方が高いことが示された。

次にトラフグの無毒肝臓を用いて、下端部と中央部との HPLC クロマトグラムを比較した結果を Fig. IV-10 に示した。マウス毒性試験では、図中の A～E 部位はすべて無毒 (5 MU/g 未満) を示したが、HPLC クロマトグラムの上でも TTX、anh-TTX、4-*epi*-TTX の有毒 3 成分は、いずれの部位からも検出されなかった。一方、TDA 濃度は、下端部より他の部位の方が高く、TDA と似たクロマトグラム挙動を示す未知成分のピークも多い傾向が認められた。

以上の検討結果から、有毒肝臓中の下端部の低毒性現象は、TTX のみならず関連物質をも含めた有毒成分の濃度が、他の部位より低いためであることが示された。このことは、肝臓の毒性検査を行う場合、下端部は、肝臓毒性の代表値とはならないことを示唆している。

この実施例は、HPLC を用いる TTX 簡易検査法が少量試料の事例検討にも十分適用できることを示している。

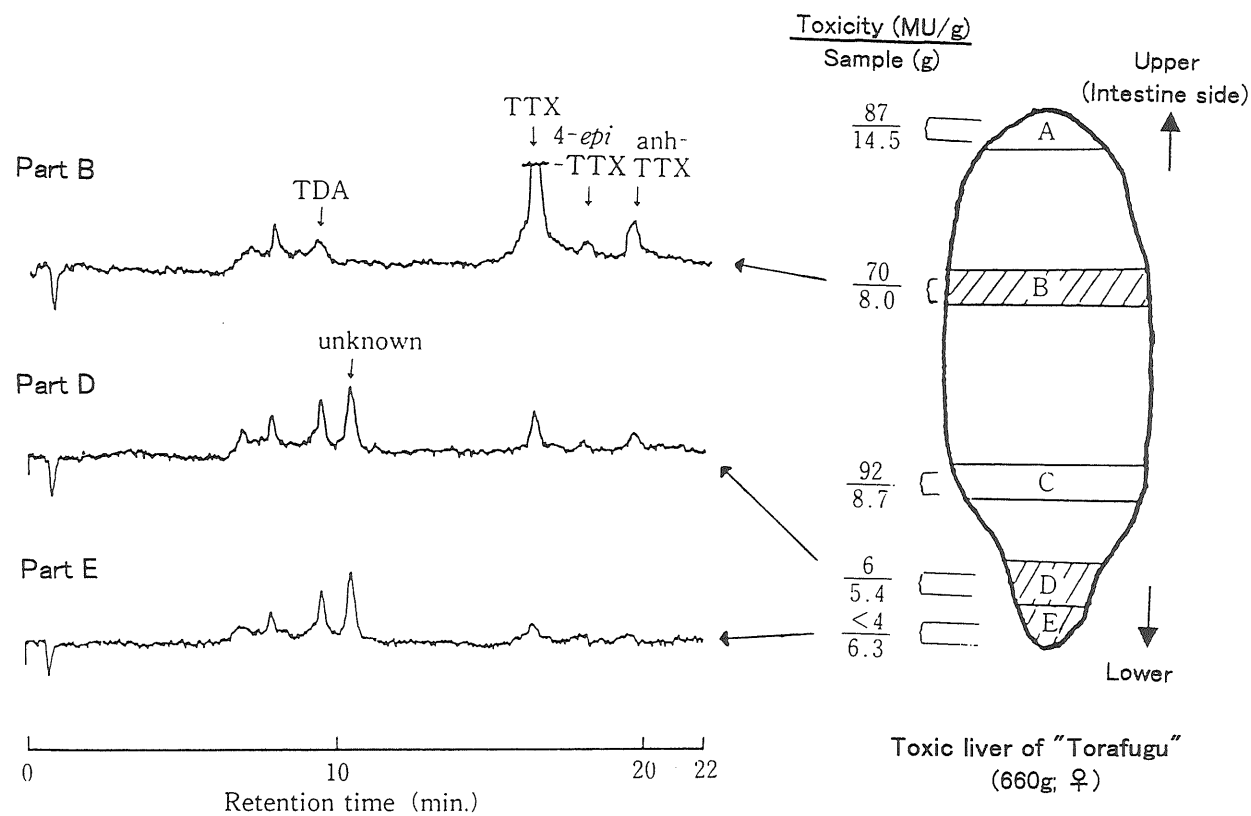


Fig. IV-8. Toxin composition and toxicity in parts of a toxic liver of puffer fish "Torafugu".

Samples were examined for toxin composition by Fuchi's HPLC method and for toxicity by the mouse assay method.

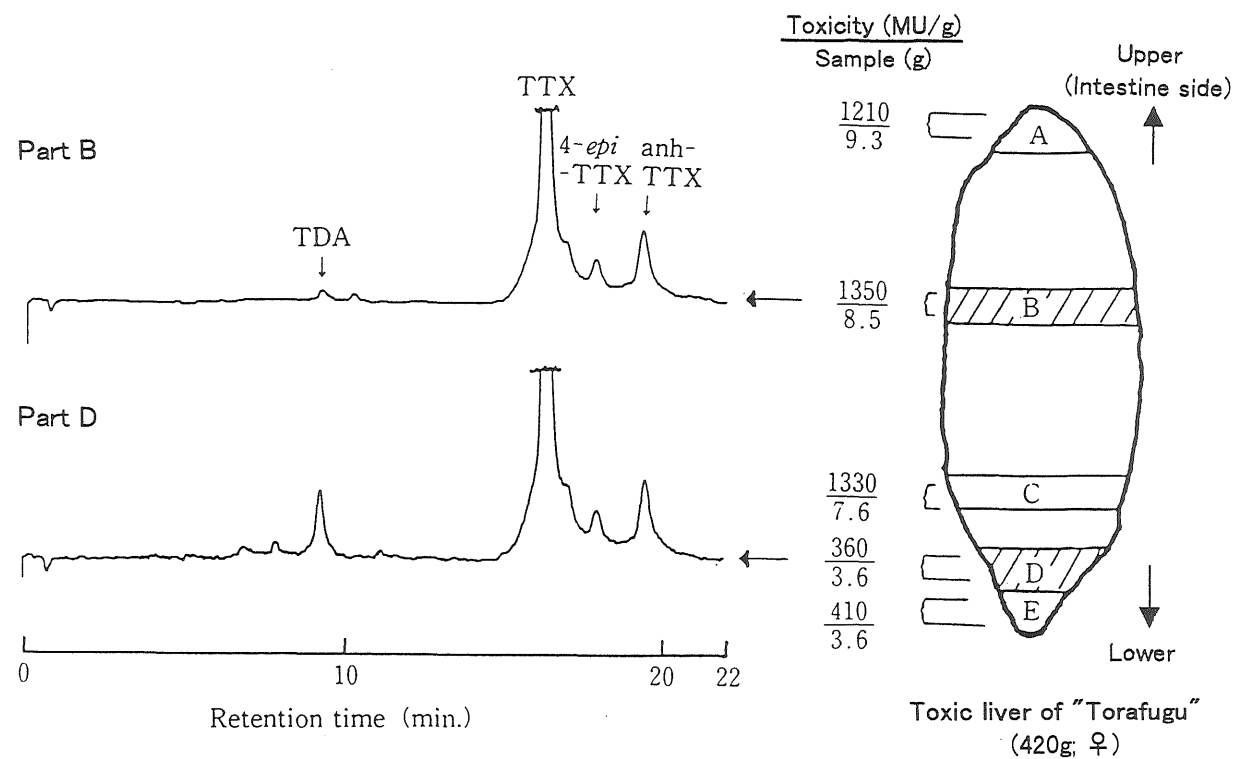


Fig. IV-9. TDA concentration and toxin composition in parts of a toxic liver of puffer fish "Torafugu".

Samples were examined for toxin composition by Fuchi's HPLC method and for toxicity by the mouse assay method.

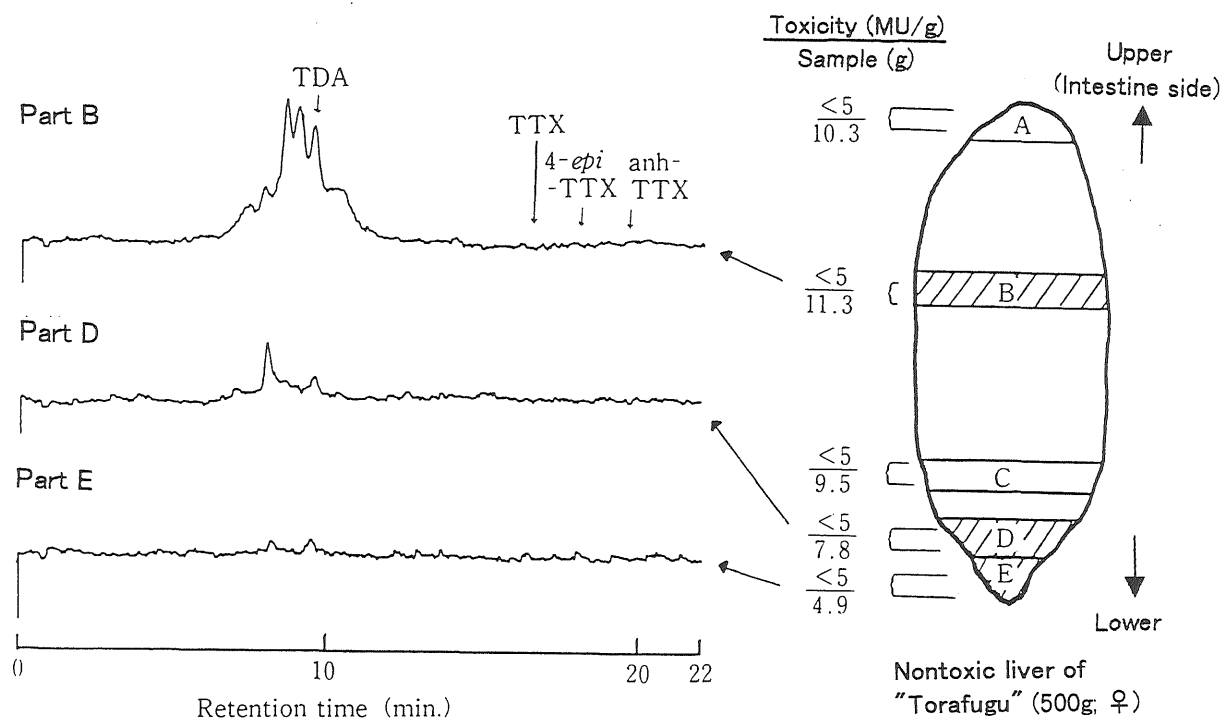


Fig. IV-10. TDA concentration and toxicity in parts of a nontoxic liver of puffer fish "Torafugu".

Samples were examined for toxin composition by Fuchi's HPLC method and for toxicity by the mouse assay method.

第4節 要 約

1. HPLC を用いる TTX 簡易検査法の確立を図った。最初に、蛍光スペクトルやアルカリ濃度、反応温度、反応コイルなどのフグ毒の蛍光化条件について検討し、蛍光強度を約 10 倍向上させた。次に試料の前処理として、SEP-PAK C₁₈ 及び BAKER 10-SPE™(SO₃H 型)の 2 種類のカートリッジカラムを用いた簡便かつ迅速なクリーンアップ操作を導入することにより、TTX 及びその関連物質を約 8 倍濃縮する方法を開発し、検出感度を向上させた。

2. これらの結果を基にして、TTX を精度よく定量する HPLC-蛍光検出法 (TTX 簡易検査法) を確立した。本法とマウス毒性試験法との測定値は、相関係数 0.99 (n=10) でよく一致した。本法はマウス毒性試験法の抽出液をそのまま用いることができ、かつ TTX のみならず関連物質の組成も分析できる。本法による平均回収率は、フグの各試料では 95.0% 以上、巻貝中腸腺では 80.4% であった。また、検出限界はフグ試料で 0.2 µg/g、巻貝試料で 0.5 µg/g であった。

3. 上記の HPLC を用いる TTX 簡易検査法の実施例として 2 例を示した。1 例は大分県で発生した死亡食中毒事件の原因究明で、患者吐物と残品のヒガンフグ頭部の筋肉から TTX を検出し、この事件は TTX による食中毒と断定された。2 例目では、フグ有毒肝臓中の毒の分布を調べ、HPLC を用いる TTX 簡易検査法が TTX 及びその関連物質の成分組成分析に適用できることを示した。例示のように検体が少量に制限されるケースでは、毒力と毒の成分組成とを簡便かつ精度よく測定できる本法は有用性が高いと考えられた。その他にも本論文の各章で示した HPLC 分析は、TTX 簡易検査法を適用して行った。

第5章 総合考察

本章においては、前章までの研究成果を概括し、その他の知見も加えて総合的に考察する。

第1章では、死者1名を含む食中毒事例のあった大分県国東沿岸産ヒガンフグとコモnfグについて、部位別及び季節別の毒性を検討した。ヒガンフグ46個体とコモnfグ34個体中、筋肉の有毒率(10 MU/g 以上)及び最高・平均毒力は、ヒガンフグが6.5%及び55 MU/g・ 2.6 ± 8.5 MU/g(S.D.)、コモnfグが41.2%及び84 MU/g・ 17 ± 24 MU/gであった。食用が不可とされる三陸沿岸産の両種フグより筋肉毒性は低いものの、ヒガンフグは毒力の個体差が著しく、コモnfグは活魚でも有毒率が19.0%と高いことから、国東沿岸産のものはいずれも食用に供せない魚種と結論した。国東半島沿岸では、両種のフグが定置網、刺網などで捕獲される。沿岸性のフグは毒性に地域差があるといわれており、三陸沿岸以外の地域で漁獲された両種の筋肉でも比較的高い毒性を検出した報告が散見される。食中毒防止の観点からは、漁獲地域にかかわらず、両種とも食用には検討を要する魚種と思われた。

次に、毒性不明魚種のホシフグ80個体について、部位別及び季節別の毒性を検討した。その結果、ホシフグは筋肉、精巣、肝臓が無毒、皮膚が弱毒(有毒率12.5%、最高毒力43 MU/g、平均毒力 4.8 ± 8.5 MU/g)、卵巣が強毒(同80.5%、890 MU/g、 120 ± 180 MU/g)、消化管が弱毒(同1.3%、21 MU/g、3 MU/g 未満)であった。豊後水道産のもの有毒部位は、初夏から秋にかけて毒性の高いことが示唆されたが、筋肉は季節変動もなく無毒で、食用が可能と判断された。大分県沖の豊後水道産フグ類の漁獲量は近年減少し、1997年は95トンで最盛時の3割を下回っている。同産フグ類の9割はトラフグで、ホシフグはまき網漁で時に大量に漁獲されるにもかかわらず毒性が不明なため利用されていない。ホシフグが食用になれば、大分県など西日本地域の水産振興に資することが期待される。

フグ毒化のバックグラウンドの観点から、豊後水道で捕獲されるフグ以外のフグ毒保有動物の毒性を調査した。巻貝 10 種 116 検体、二枚貝 1 種 16 検体、カニ 4 種 17 検体を調べ、ボウシュウボラ、テングニシ(以上、巻貝)、スベスベマンジュウガニの 3 種から毒性を検出した。このうち、中腸腺にフグ毒が局在するとされる巻貝ボウシュウボラ 56 個体の毒性は、10 MU/g 以上の有毒率が 64.3 %で、最高毒力 750 MU/g、最高毒量 55,000 MU に達した。これはヒトの致死量とされる 10,000 MU を超えており、食中毒事例のある静岡県・和歌山県産のものと比べてもやや低いか同程度で、同じく食中毒事例のある宮崎県産のものを上回る毒化状況を示していた。この地域で食習慣のある巻貝類については、中腸腺を除去して摂食するよう周知する必要があると思われた。

第 2 章では、大分地方のフグ料理専門店で長年提供されていた伝統食品「キモ料理」について、秘伝とされる“毒抜き”調理方法の除毒効果とそのメカニズムを検討した。調理前毒力 62~1,270 MU/g のフグの肝臓 21 検体を肝臓調理法で処理すると、調理後にはすべて 5 MU/g 未満となり、厚生省の無毒基準(10 MU/g 以上)を満足していた。この伝統的なフグ肝臓調理法は大別すると細切・手揉み・煮沸の 3 調理工程から成っており、肝臓毒力は各工程ごとに減少した。特に、手揉み工程と 1 回目の煮沸工程での除毒効果が顕著で、約 80~90%の毒量が除去された。煮沸工程での減毒は、指数関数的であった。HPLC 分析等の結果から、手揉み工程はフグ毒の溶出除去により、煮沸工程は加熱によりテトロドトキシン(TTX)がより弱毒なアンヒドロテトロドトキシン(anh-TTX)へ、更に無毒なテトロドン酸(TDA)へと順次構造変化することで減毒していくメカニズムが明らかになった。

上記の「キモ料理」は大分地方で長年提供されていたが、1983 年 12 月の厚生省通知により現在は禁止されている。同通知の例外として、有毒部位を用いた製品にもかかわらず食用が許可されている石川県産「フグ卵巣の糖漬」と山口県産「ゴマフグの皮」は、いずれも塩蔵品のため摂食量が僅かで、また製品のロット管理を行って食品としての安全性を確認している。大分地

方の「キモ料理」が食用として供されるには、このような安全性の確保が必要と考えられる。それにはフグ肝臓の最高毒力を把握しておく必要があり、この点に関して検討した。「キモ料理」に用いられてきたフグのほとんどはトラフグとカラスであったことから、両種の肝臓毒性を調べた。大分県内のフグ専門店に入荷した西日本近海産のトラフグ 242 個体とカラス 50 個体の肝臓毒性は、トラフグが有毒率 17.8%、最高毒力 1,270 MU/g で、カラスがそれぞれ 12.0%、130 MU/g であった。両種の肝臓とも 1,000 MU/g を超える個体は極めて稀と推察されたが、フグ肝臓を除毒加工して食用に供するには、1,000 MU/g を超える有毒肝臓を確実に無毒化する方法の開発が不可欠と考えられた。また、トラフグでは肝臓重量 200g 以上のものの方が 200g 未満のものより強毒性の傾向を示したが、大分地方の「キモ料理」に使用されるトラフグは、通常、当地産の 1kg 程度の小ぶりのものが大半といわれており、肝臓重量と毒性との関係が推察された。

引き続いて第 3 章では、除毒によるフグ肝臓の加工利用について検討した。まず、これまで調べられていない有毒フグ肝臓中の毒の分布を調査した。トラフグ 6 個体、カラス 1 個体、コモンフグ 3 個体を用いて有毒肝臓中の毒力分布の変動係数 (C. V.) を調べた結果、トラフグ 3 個体とカラス 1 個体の肝臓 (毒力 29~278 MU/g) がマウス毒性試験法の誤差範囲 (C. V. =20%) を超える変動係数 24.0~41.2% を示した。これらの肝臓では、下端部 (消化管側) の毒力だけが顕著に低く、この部分 (肝臓重量の 1.3~6.1%) を除いたときの変動係数は 6.6~14.2% で測定誤差の範囲内であった。肝臓下端部の低毒性現象は、肝臓重量の大きい個体でみられたが、肝臓加工の除毒実験には肝臓の両端部をそれぞれ 10% 以上切除して用いることにした。

次に、フグ肝臓調理法の煮沸工程での減毒効果を調べるため、TTX の熱安定性を検討した。トラフグの有毒肝臓抽出液を中性または pH 4 の酸性下で 30 分間直火または水浴加熱したときの減毒率は、中性液が直火加熱で 68.2%、水浴加熱で 43.2% に対し、酸性液が直火加熱で 25.8%、水浴加熱で 17.4% であった。また、TTX 標品水溶液及びトラフグの有毒肝臓を中性下オートク

レーブで 120℃加熱すると、両者とも 100℃加熱より減毒率が高かった。水溶液中のフグ毒は、加熱時の液性と温度によっては従来いわれているほど熱に安定でないことが明らかにされ、特にオートクレーブによる 120℃加熱は煮沸加熱より高い除毒効果が得られることが分かった。また、フグ肝臓調理法の煮沸工程では、加熱 20 分を境として減毒率に違いがみられ、加熱 20 分までの方が 20 分以後より減毒率が高かった。その減毒傾向を調理除毒 11 例から求めた結果、加熱時間と毒力の関係は一次式に回帰され、除毒の推定式が算定された。調理除毒法においては、煮沸前の肝臓毒力を知ることにより、毒性消失までの煮沸時間を推定することも可能と考えられた。

更に、肝臓調理法について調理工程ごとの除毒効果を検討した結果、除毒には細切・手揉み・煮沸の 3 工程はいずれも不可欠で、“手揉み”時間は 3 分間で十分なものの、“細切”はできるだけ小さくし、加熱は 100℃を超える温度で行うと更に高い除毒効果が得られた。有毒肝臓をオートクレーブで 120℃加熱すると、手揉みなしでも伝統的肝臓調理法の煮沸工程より短い加熱時間で同等に除毒された。厚生省通知で食用が許可されている卵巣と皮の加工品は、長期間塩蔵処理して徐々に除毒する方法であるのに対して、肝臓調理法は調理工程を工夫して除毒を短時間で行っている。それだけに除毒は確実に行う必要があり、本研究で検討したオートクレーブ 120℃加熱は肝臓調理法より正確な除毒ができる。このような管理された調理方法でなければ、「キモ料理」の安全な提供は困難と思われた。

以上の結果から、缶詰加工技術などによる正確な温度管理や製品の毒性学的ロット管理など、食品としての安全性を確保する手段を講じることで、本来有毒部位であるフグの肝臓を有効利用できることが分かった。現在は未利用のフグ肝臓を資源として利用し、大分地方の伝統食品「キモ料理」を復活させる方向づけができたことから、この地方の水産業や食品業ならびに関連業種の活性化に役立つことが期待される。

第 4 章では、簡易なフグ毒検査法の確立とその汎用化について検討した。現在、フグ毒の定量は、マウス毒性試験法が公定法とされている。しかし、

マウス管理の煩雑さや生物学的判定に伴う精度の問題などから化学的定量法の開発も試みられてきたが、これらの方法は一般に多量の試料と、かなり複雑な精製操作を必要とし、サンプル量が制限される食中毒時の検査やルーチンの業務には適用が難しいケースもみられる。この点に留意して、HPLCを用いた簡便なフグ毒定量法の開発を試みた。

最初に蛍光スペクトルやアルカリ濃度、加熱温度、反応時間などの蛍光体化条件について検討した結果、従来のものより約 10 倍蛍光強度を向上させることができた。次に、簡便かつ迅速に検液を調製する前処理法の改良を行い、SEP-PAK C₁₈ カラムと BAKER 10-SPE™ スルホン酸型カラムの 2 種類のカートリッジカラムを用いることでクリーンアップとフグ毒の濃縮が可能になった。この方法での濃縮効果は約 8 倍であった。以上の検討により、魚貝類中のフグ毒を簡便かつ精度よく定量する HPLC 検査法が確立できた。本法はマウス毒性試験法の抽出液をそのまま用いることができ、TTX のみならず関連物質の組成分析も可能で、本法とマウス毒性試験法との測定値は、相関係数 0.99 (n=10) でよく一致した。検出限界はフグ試料で 0.2 μg/g、巻貝試料で 0.5 μg/g であった。

この TTX 簡易定量法を用いて、1988 年に大分県で発生したヒガンフグの筋肉摂食による死亡事件の原因究明を行った。患者の吐物と残品のヒガンフグ頭部の筋肉から TTX を検出し、この事件はフグによる食中毒であると迅速に断定できた。また、第 3 章で有毒肝臓中の毒の分布に違いがみられた事例における適用では、毒力の違いがフグ毒及びその関連物質の成分組成の違いに基づくことを明らかにした。その他にも本論文の各章で示した HPLC 分析は、TTX 簡易定量法を用いて行った。このように検体が少量に制限されるケースでは、毒力と毒の成分組成とを同時に、簡便かつ精度よく測定できる本法は有用性が高く、公定法のマウス毒性試験法や従来の化学的検査法に代わる方法として広く応用されることが期待できる。

以上、本研究は西日本産のフグ及びフグ毒保有動物を用い、フグ食中毒の

防止と未利用フグ資源の有効利用を主な目的として実施した。その結果、フグの毒性の地域差や毒性不明種についていくつかの新知見が得られるとともに、本来有毒部位であるフグの肝臓を加工処理によって有効利用する方向づけができた。また、HPLCを用いる簡便なフグ毒の化学的定量法を確立し、その汎用化を図った。

謝 辞

本研究の機会を与え、その遂行に際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました長崎大学大学院海洋生産科学研究科教授 野口玉雄先生に衷心より感謝申し上げます。

本論文作成に際し、数々の御助言と御校閲を賜りました長崎大学大学院海洋生産科学研究科教授 多部田 修先生、同教授 村松 毅先生、同教授 野崎 征宣先生に心から御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御指導と御意見を賜りました長崎大学水産学部助教授 故・赤枝 宏先生に深く感謝申し上げます。また、種々有益な御助言と御激励を賜りました茨城大学前学長 橋本周久先生 に深甚なる謝意を表します。さらに、実際面で多大なる御教示と御協力を頂きました東海大学海洋学部助教授 斎藤俊郎先生並びに東京水産大学助教授 長島裕二先生に深謝申し上げます。

研究の実施にあたり、御支援と御協力を頂きました長崎大学水産学部水産食品研究室の各位、大分県衛生環境研究センターの各位 特に局 伸男氏、大分県林業水産部水産振興課 寿 久文氏、大分県宇佐高田保健所 仲摩 聡氏、大分県食肉衛生検査所 成松浩志氏に心より御礼申し上げます。

また、本研究の着手と実施に際し、種々御尽力頂きました大分県衛生環境研究センター元所長 林 薫博士(長崎大学名誉教授)、同元所長 大友信也博士、同元所長 橘 宣祥博士、同現所長 牧野芳大博士、同微生物部長 帆足喜久雄氏に厚く御礼申し上げます。

試料の入手に際し、数々の御協力を頂きました大分県海洋水産研究センターの各位 特に尾上静正氏、大分県生活環境部生活衛生課の各位、大分県保健所衛生課の各位 特に平川英敏氏、並びに田島義久氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- BROWN, M.S. and H.S. MOSEHR (1964): Tarichatoxin: Isolation and purification. *Science*, 140, 295-296.
- 遠藤隆二 (1984): フグ毒に関する研究. *J. Toxic. Sci.*, 9, 1-11.
- 福田得志 (1936): 河豚毒並びに其中毒学. 実地医家と臨床, 13, 437-447.
- GOTO, T., KISHI, Y., TAKAHASHI, S. and HIRATA, Y. (1965): Tetrodotoxin. *Tetrahedron*, 21, 2059-2088.
- JEON, J.K., K. MIYAZAWA, T. NOGUCHI, H. NARITA, S. MATSUBARA, M. NARA, K. ITO and K. HASHIMOTO (1986): Occurrence of paralytic toxicity in marine flatworms. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1065-1069.
- 原田禎顕・内田要市 (1996): 有明海産ナシフグ *Fugu vermiculais vermiculais* 活魚の毒性. 日水誌, 62, 189-194.
- 橋本周久編 (1988): フグ毒研究の最近の進歩, p.34-35. 恒星社厚生閣.
- 加納碩雄・野口玉雄・村上俊一・橋本周久 (1984a): 三陸産ヒガンフグの毒性. 食衛誌, 25, 24-29.
- 加納碩雄・野口玉雄・丸山純一・橋本周久 (1984b): 東京中央卸売市場に入荷したヒガンフグの毒性. 日水誌, 50, 985-990.
- 加納碩雄・野口玉雄・大塚正人・橋本周久 (1984c): カラスとトラフグの毒力の比較. 食衛誌, 25, 436-439.
- 加納碩雄・野口玉雄・丸山純一・上村俊一・橋本周久 (1985a): 三陸産ゴマフグの毒性. 日水誌, 51, 121-125.
- 加納碩雄・銭 重均・佐藤之紀・丸山純一・野口玉雄・橋本周久 (1985b): 東京湾産ショウサイフグの毒性. 食衛誌, 26, 489-495.
- 川崎光宣・長岡義則・石原寛久 (1978): フグ肝臓の調理工程における毒性に関する研究. 昭和 53 年度全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録, p.156-159.
- KAWATSU, K., HAMANO, Y., YODA, T., TERANO, Y. and SHIBATA, T. (1997):

- Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 50, 133-150.
- ・ KIM,Y.H., BROWN,G.B., MOSHER,H.S. and FUHRMAN,F.A. (1975):
Tetrodotoxin: Occurrence in atelopus frog of Costa Rica. *Science*, 189, 151-152.
 - ・北濱喜一郎 (1984): 両性(雌雄同体)フグ. フグ大学, p.74-79. 保育社.
 - ・ KODAMA,M., OGATA,T., KAWAMUKAI,K., OSHIMA,Y. and YASUMOTO,T.
(1984): Toxicity of muscle and other organs of five species of puffer collected from the Pacific coast of Tohoku area of Japan. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 50, 703~706.
 - ・桑原 連・加納碩雄・野口玉雄・橋本周久(1983): ヒガンフグの消化管内容物の検索. 昭和 58 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.221.
 - ・厚生省環境衛生局長通知 (1983): フグの衛生確保について. 昭和 58 年 12 月 2 日, 環乳第 59 号.
 - ・厚生省環境衛生局編 (1978): 食品衛生検査指針Ⅱ, p.232-240. 日本食品衛生協会.
 - ・厚生省生活衛生局監修 (1990): 食品衛生検査指針(微生物編), p.134-144. 日本食品衛生協会.
 - ・厚生省生活衛生局監修 (1991): 食品衛生検査指針(理化学編), p.296-300. 日本食品衛生協会.
 - ・厚生省生活衛生局編集 (1996): 平成 8 年食中毒統計. 厚生省生活衛生局.
 - ・近藤宏一・境 正・袈裟丸倉基・野口玉雄・橋本周久・田仲謙次郎 (1988): 巻貝ボウシュウボラの摂食によるテトロドトキシン(フグ毒)中毒の1例 . 日本内科会誌, 77, 107-108.
 - ・丸山純一・野口玉雄・銭 重均・山崎公男・橋本周久 (1983): 巻貝ボウシュウボラにおけるテトロドトキシンの新検出例. 食衛誌, 24, 465-468.
 - ・ MATSUMURA,K. (1995): A monoclonal antibody against tetrodotoxin that reacts to the active group for toxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 293, 41-45.

- MIYAZAWA,K, HIGASHIYAMA,M., ITO,K., NOGUCHI,T., ARAKAWA,O., SHIDA,Y. and HASHIMOTO,K. (1988): Tetrodotoxin in two species of ribbon worm (nemertini), *Lineus fuscoviridis* and *Tubulanus punctatus*. *Toxicon*, 26, 867-874.
- MOSHER,H.S., FUHRMAN,F.A., BUCHWALD,H.D. and FISCHER,H.G. (1964): Tarichatoxin-Tetrodotoxin: A potent neurotoxin. *Science*, 144, 1100-1110.
- NAGASHIMA,Y., MARUYAMA,J., NOGUCHI,T. and HASHIMOTO,K. (1987): Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography. *Bull.Japan Soc.Sci.Fish.*, 53, 819-823.
- 長島裕二・横山祐一郎 (1988): 特殊条件下における食品の加工とそれらの品質評価-高圧力下におけるフグ毒の変化-. 昭和 63 年度東京水産大学教育研究特別経費成果報告書, p.1-6.
- 長田 浩・野中 守・赤枝 宏・野口玉雄 (1996): 長崎県産コモンフグの毒性. 平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.179. 神奈川.
- NAKAMURA,T. and YAMAMOTO,T. (1985): Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon*, 23, 271-276.
- 名取信策・池川信夫・鈴木真言編 (1977): 天然有機化合物実験法, p.549. 講談社.
- NARITA,H., NOGUCHI,T., MARUYAMA,J., UEDA,Y., HASHIMOTO,K., WATANABE,Y. and HIDA,K. (1981): Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell, "Boshubora" *Charonia sauliae*. *Bull.Japan Soc.Sci.Fish.*, 47,985-941.
- 成田弘子・野口玉確・岩根正三・肥田規矩男 (1982): 清水市三保産貝類の毒性調査. 静岡県環境センター報告, 25, 147-151.
- NARITA,H., NOGUCHI,T., MARUYAMA,J. and HASHIMOTO,K. (1984): Occurrence of a tetrodotoxin-associated substance in a gastropod, "Hana-mushirogai" *Zeuxis siquijorensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50, 85-88.
- NARITA,H., MATSUBARA,S., MIWA,N., AKAHANE,S., MURAKAMI,M., GOTO,T., NARA,M., NOGUCHI,T., SAITO,T., SHIDA,T. and HASHIMOTO,K.

- (1987): *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 617-621.
- NOGUCHI,T. and HASHIMOTO,Y. (1973): Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger*. *Toxicon*, 9, 79-84.
 - NOGUCHI,T., MARUYAMA,J., UEDA,Y., HASHIMOTO,K. and HARADA,Y. (1981): Occurrence of tetrodotoxin in the Japanese Ivory shell *Babylonia japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 909-913.
 - NOGUCHI,T., NARITA,H., MARUYAMA,J. and HASHIMOTO,K. (1982): Tetrodotoxin in the starfish *Astropecten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, "Boshubora" *Charonia sauliae*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48, 1173-1177.
 - NOGUCHI,T., UZU,A., KOYAMA,K. and HASHIMOTO,K. (1983): Occurrence of a tetrodotoxin as the major toxin in xanthid crab *Atergatis floridus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49, 1883-1886.
 - NOGUCHI,T., MARUYAMA,J. NARITA,H. and HASHIMOTO,K. (1984): Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Tutufa lissostoma* (frog shell). *Toxicon*, 22, 219-226.
 - NOGUCHI,T., JEON,J.K., ARAKAWA,O., SUGITA,H., DEGUCHI,Y., SHIDA,Y. and HASHIMOTO,K. (1986): Occurrence of a tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus*. *J. Biochem.*, 99, 311-314.
 - 野口玉雄 (1993): マリントキシンの最近の研究動向. 衛生化学, 39, 81-93.
 - NOGUCHI,T., AKAEDA,H. and JEON,J.K. (1997): Toxicity of a puffer, *Takifugu vermiculais* -1, Toxicity of alive *T. vermiculais* from Japan and Korea. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 38, 132-139.
 - NUNEZ,M.T., FISHER,S. and JAIMOVICH,E. (1976): A fluorometric method to determine tetrodotoxin. *Anal. Biochem.*, 72, 320-325.
 - 大分県生活環境部生活衛生課編集 (1998): 平成 9 年大分県食中毒事件録,

p.12~13. 大分県生活環境部.

- ・ ONOUE,Y., NOGUCHI,T., NAGASHIMA,Y., HASHIMOTO,K., KANO,H., S., ITO,M. and TSUKADA,K. (1983): Separation of tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons by high-performance liquid chromatography with a fluorometric detection using *o*-phthalaldehyde. *J. Chromatogr.*, 257, 375-379.
- ・小沢千重子 (1983a): フグ卵巣ぬか漬けの毒性. 食衛誌, 24, 258-262.
- ・小沢千重子 (1983b): アルカリ添加が塩漬け中のフグ卵巣の毒性に及ぼす影響. 食衛誌, 24, 263-267.
- ・小沢千重子 (1986): “マフグ卵巣ぬか漬け”の製造時における重曹の減毒効果. 日水誌, 52, 2177-2181.
- ・境 正 (1985): 東九州産肉食性巻貝の毒性-重要貝類の毒化機構とその有毒成分に関する研究-. 昭和 58, 59 年度科学研究費補助金(総合研究 A)研究成果報告書, p.112-119.
- ・ SHEUMACK,D.D., HOWDEN,M.E.H., SPENCE,I. and QUINN,R.J. (1978): Maculotoxin: A neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. *Science*, 199, 188-189.
- ・塩見一雄・田中栄治・熊谷純智・山中英明・菊池武昭・河端俊治 (1984): 冷凍フグ解凍時における筋肉の毒化. 日水誌, 50, 341-347.
- ・塩見一雄・柴田 哲・山中英明・菊池武昭 (1985): 冷凍フグ解凍時における筋肉の毒化に影響を及ぼす諸因子の検討. 日水誌. 51, 619-625.
- ・城田 直・藤田寛一・河村正朗 (1952): 河豚毒素の研究. 高峰研究所年報, 45-49.
- ・清水千秋・松居 隆・佐藤英雄・山森邦夫 (1984): フグの毒. 海洋科学, 16, 560-565.
- ・ SIMIDU,U., NOGUCHI,T., HWANG,D.F., SHIDA,Y. and HASIMOTO,K. (1987): Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1714-1715.
- ・末兼敏男・八木昭介 (1970): フグ毒に関する研究. 山口大学農学部学術報告,

21, 1-19.

- ・高久 久・足達卓治・加納碩雄・白坂康郎・三好和彦・宮崎奉之・新井加代子・向島 雄 (1976): フグの毒性について. 昭和 51 年版東京都市場衛検事業概要. 東京都市場衛生検査所報, p.359-370.
- ・田口博人 (1984): フグの衛生と取扱い. 食衛研, 34, 113-137.
- ・谷 巖 (1945): 日本産フグの中毒学的研究. 帝国図書. 東京.
- ・寺崎 潜 (1978): 種類不明のふぐ(以下不明 No.1 という)及びホシフグの毒性について(中間報告). 北九州市食品衛生検査所報, p.20~24.
- ・津田恭介 (1967): フグ毒の構造. 化学の領域(増刊 80 号), p.9-42. 南江堂.
- ・坪内春夫・麻野間正晴・森下茂俊・坂部美雄 (1984): ヒガンフグの毒性について, 名古屋市衛生研究所報, 30, 81-83.
- ・YASUMOTO,T., NAKAMURA,M., OSHIMA,Y. and TAKAHATA,J. (1982): Construction of a continuous tetrodotoxin analyzer. *Bull.Japan Soc.Sci.Fish.*, 48, 1481-1483.
- ・YASUMOTO,T. NAGAI,H., YASUMURA,D., MICHISHITA,T., ENDO,A., YOTSU,M. and KOTAKI,Y. (1986): Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin. In "Tetrodotoxin, saxitoxin, and the molecular biology of the sodium channel" (ed. by B.BOLAND *et al.*) *Ann. New York Acad. Sci.*, 479, 44-51.
- ・安元 健 (1992): 海洋生物毒の化学および動態に関する研究. 日水誌, 66, 1195-1201.